



Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento

Departamento de Farmacología y Terapéutica

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

***ESTUDIO COMPARATIVO DE SEÑALES DE
CALCIO Y DE EXOCITOSIS EN LAS CÉLULAS
CROMAFINES DE EMBRIONES DE RATA Y EN LAS
DE SUS MADRES***

Memoria de Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor
presentada por

José Carlos Fernández Morales

Directores:
Antonio Miguel García de Diego
Antonio García García

Madrid, abril de 2013

Dedicatoria

Agradecimientos

Poema

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

[Ca²⁺]_c	Concentración de Ca ²⁺ citosólico
AgaIVA	ω-agatoxina IVA
BK_{Ca}	Canales de K ⁺ dependientes de Ca ²⁺ de alta conductancia
CCB	Célula cromafine bovina
CCDV	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje
CCER	Célula cromafín embrionaria de rata
CCM	Célula cromafín de rata madre
CICR	Liberación de Ca ²⁺ inducida por calcio (Calcium-Induced Ca ²⁺ Release)
DHP	Dihidropiridinas
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
GVIA	ω-conotoxina GVIA
HI	Hipoxia intermitente
HVA	Canales de calcio de alto umbral de activación
I_{Ca}	Corriente de calcio
K_{ATP}	Canales de K ⁺ activados por ATP
K_{Ca}	Canales de K ⁺ dependientes de Ca ²⁺
KO₂	Canales de K ⁺ activados por diferencias en la concentración de oxígeno
Kv	Canales de K ⁺ dependientes de voltaje
LVA	Canales de calcio de bajo umbral de activación
MCU	Uniportador de Ca ²⁺ mitocondrial (Mitochondrial Ca ²⁺ uniporter)
MVIIC	ω-conotoxina MVIIC
nAChRs	Receptores de acetilcolina nicotínicos
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ de la membrana plasmática
PA	Potencial de acción
pO₂	Presión parcial de oxígeno
Qamp	Carga amperométrica, secreción acumulativa o tamaño cuántico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SERCA	Ca ²⁺ -ATPasa del retículo endoplásmico
SK_{Ca}	Canales de K ⁺ dependientes de Ca ²⁺ de baja conductancia
SMSI	Síndrome de muerte súbita infantil
V_m	Potencial de membrana
VND	Vesículas grandes de núcleo denso

ÍNDICE

1.- <u>MARCO Y ORGANIZACIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL</u>	1
2.-<u>INTRODUCCIÓN</u>	6
2.1 <i>Médula adrenal y células cromafines</i>	8
2.1.1 <u>Generalidades</u>	8
2.1.2 <u>Potencial de membrana y potencial de acción</u>	11
2.1.3 <u>Vesícula de secreción en células cromafines</u>	14
2.1.4 <u>La médula adrenal y el tono simpático</u>	17
2.1.5 <u>La célula cromafín embrionaria y la adaptación fetal al nacimiento</u>	21
2.1.6 <u>Sensibilidad a oxígeno en la etapa perinatal: La célula cromafín como sensor de oxígeno</u>	25
2.2 <i>Papel del calcio en las células cromafines</i>	27
2.2.1 <u>El ion Ca^{2+} como mensajero intracelular</u>	27
2.2.2 <u>Homeostasia del ion Ca^{2+} en célula cromafín</u>	29
2.2.3 <u>Fuentes extracelulares de calcio</u>	32
2.2.3.1 Canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV)	32
2.2.3.2 Propiedades funcionales y farmacológicas de los distintos subtipos de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV)	40
2.2.3.3 CCDV tipo T: características electrofisiológicas y farmacológicas de los CCDV de tipo T frente a los no tipo T	44
2.2.3.4 CCDV en la célula cromafín de rata adulta y embrionaria	50
2.2.4 <u>Fuentes intracelulares de calcio</u>	51
2.2.5 <u>Sistemas de eliminación y regulación del calcio citosólico</u>	54
2.2.6 <u>La exocitosis en la célula cromafín</u>	57
2.2.6.1 La cinética de la respuesta secretora y los distintos contingentes de vesículas	63
2.2.6.2 Acoplamiento entre los distintos subtipos de CCDV y las vesículas secretoras	69
2.3 <i>Canales de K^+ dependientes de voltaje (Kv)</i>	72
2.3.1 <u>Canales de K^+ que presentan 6 segmentos transmembrana y un poro (6TM-1P)</u>	73
2.3.2 <u>Canales de K^+ que presentan 2 segmentos transmembrana y un poro (2TM-1P)</u>	75
2.3.3 <u>Canales de K^+ que presentan 6 segmentos transmembrana y un poro (4TM-2P)</u>	76

2.4 Hipoxia	77
2.4.1 <u>Tipos de Hipoxia</u>	77
2.4.1.1 Hipoxia hipóxica	77
2.4.1.2 Hipoxia hipémica	78
2.4.1.3 Hipoxia por estancamiento	78
2.4.1.4 Hipoxia histotóxica	78
2.4.2 <u>El cuerpo carotídeo y la hipoxia</u>	78
2.4.3 <u>La célula cromafin y la hipoxia</u>	84
2.4.4 <u>El Síndrome de muerte súbita infantil y la hipoxia</u>	91
3.- <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	95
4.-<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	102
4.1 <i>Cultivo de células cromafines</i>	103
4.1.1 <u>Aislamiento y cultivo de células cromafines embrionarias de rata (CCER)</u>	103
4.1.2 <u>Aislamiento y cultivo de células cromafines de la rata madre (CCM)</u>	105
4.1.3 <u>Aislamiento y cultivo de células cromafines bovinas (CCB)</u>	105
4.2 <i>Soluciones utilizadas en la elaboración de los medios de cultivo y en los procedimientos experimentales</i>	106
4.2.1 <u>Medio de cultivo para células cromafines: Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)</u>	106
4.2.2 <u>Solución salina utilizada en el transporte de las glándulas y en la elaboración de los cultivos: solución de Locke 1X</u>	109
4.2.3 <u>Solución salina de Tyrode 1X y soluciones despolarizantes de alto potasio</u>	110
4.2.4 <u>Solución salina utilizada en los experimentos de hipoxia</u>	111
4.3 <i>Técnica de amperometría en célula única</i>	111
4.3.1 <u>Generalidades</u>	111
4.3.2 <u>Elaboración de los electrodos de amperometría</u>	116
4.3.3 <u>Procedimiento para la realización de los registros de amperometría</u>	119
4.3.4 <u>Análisis de los parámetros amperométricos de número de espigas, carga amperométrica total acumulada y de los parámetros cinéticos de espiga única</u>	123
4.4 <i>Medida en tiempo real de la liberación de catecolaminas mediante la técnica de amperometría en poblaciones de células cromafines bovinas</i>	126

4.5- Registro de corrientes iónicas mediante la técnica de patch-clamp	127
4.5.1 <u>Generalidades</u>	127
4.5.2 <u>Procedimiento</u>	132
4.5.3 <u>Medida de la exocitosis mediante el estudio de la variación de la capacidad eléctrica de la membrana celular</u>	134
4.5.4 <u>Metodología para el estudio de los diferentes contingentes de vesículas cromafines</u>	136
4.5.4.1 Protocolo de doble pulso o de pulsos pareados	136
4.5.4.2 Procedimiento	139
4.6 Medidas de los cambios de la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_c$)	140
4.6.1 <u>Generalidades</u>	140
4.6.2 <u>Procedimiento</u>	144
4.7 Estudio de las diferencias ultraestructurales en la distribución de vesículas cromafines mediante la técnica de microscopía electrónica	145
4.7.1 <u>Generalidades</u>	145
4.7.1.1 Microscopía electrónica de transmisión	146
4.7.1.2 Microscopía electrónica de barrido	147
4.7.2 <u>Procedimiento</u>	147
5.- <u>RESULTADOS (RESUMEN ARTÍCULOS)</u>	149
6.- <u>DISCUSIÓN</u>	167
7.- <u>CONCLUSIONES</u>	187
8.- <u>AYUDAS DE INVESTIGACIÓN</u>	193
9.- <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	195
10.- <u>APÉNDICE ARTÍCULOS</u>	239
10.1 Artículo 1	A-I
10.2 Artículo 2	A-XV
10.3 Artículo 3	A-XIX
10.4 Artículo 4	A-XLI
10.5 Artículo 5	A-LXXII
10.6 Artículo 6-11	A-CXXV

MARCO DE ESTA TESIS DOCTORAL

1.- MARCO Y ORGANIZACIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL

Esta Tesis Doctoral se enmarca en el contexto de la hipótesis de la *triada funcional*, que se sugirió en el año 2000 por los laboratorios de Antonio García García y Javier García Sancho, y revisamos en 2006 (García y col., 2006) y en 2012 (García y col., 2012). Esta triada formada por los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV), la mitocondria y el retículo endoplásmico controla la cinética de los transientes de Ca^{2+} y la exocitosis durante la activación de las células cromafines; según la figura adjunta:

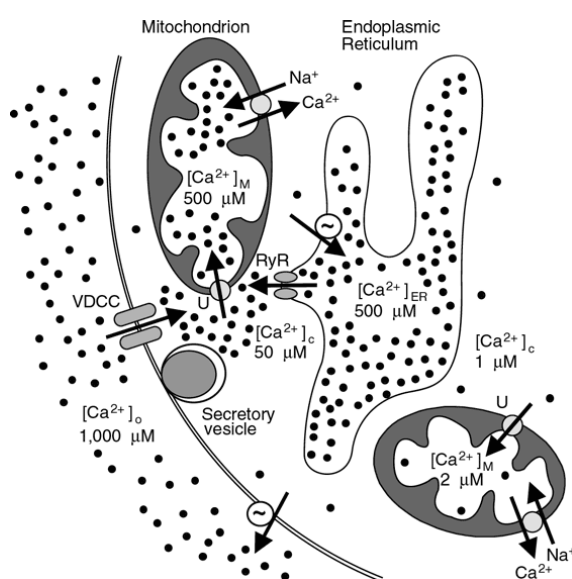


Figura adjunta: La triada funcional compuesta por los CCDV (VDCC), el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (U) de las mitocondrias más cercanas a la membrana plasmática y el receptor de rianodina (RyR) del retículo endoplásmico, junto con las vesículas secretoras se encuentran estratégicamente localizados cerca de la membrana plasmática. Figura tomada de Montero y col., 2000.

En esta Tesis Doctoral hemos estudiado el papel de los elementos de la triada funcional para modelar los CCDV, la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y la exocitosis en respuesta a distintos estímulos; así como la regulación de esta última por el antioxidante resveratrol, donde está implicado de nuevo el RE, junto a unos leves transientes de calcio citosólico que genera y un mecanismo ligado a la producción de nitritos y NO. Hemos centrado

nuestra atención particularmente en los factores que regulan la exocitosis en la vida fetal, en la respuesta a la hipoxia y frente a otros estímulos despolarizantes.

La tesis por tanto incluye una extensa introducción sobre la célula cromafín; de forma más genérica hemos hecho un compendio del papel y la homeostasia del calcio en las células cromafines, describiendo las distintas fuentes extracelulares e intracelulares del calcio; presentamos un estudio detallado sobre la exocitosis en la célula cromafín, una breve recopilación de los canales de K^+ que se encuentran íntimamente vinculados en la respuesta a hipoxia, hemos hecho un resumen sobre el cuerpo carotídeo, que es el sensor de oxígeno de los mamíferos en la etapa adulta, y un exhaustivo estudio sobre lo que se conoce hasta el momento sobre la hipoxia en la célula cromafín embrionaria y la adaptación fetal al nacimiento, describiendo detalladamente el papel como sensor de oxígeno de la célula cromafín embrionaria, así como algunas relaciones fisiopatológicas que se establecen con este estímulo hipóxico.

La Tesis Doctoral además incluye una sección de Materiales y Métodos muy detallada, donde explicamos las técnicas experimentales y los procedimientos técnicos que hemos llevado a cabo, hacemos una relación exhaustiva de la composición de las diferentes soluciones que hemos utilizado a lo largo de toda la labor experimental, y describimos la metodología necesaria para desarrollar los distintos cultivos celulares. La Tesis Doctoral además se compone de una breve Discusión restringida a la hipoxia y a la comparación entre la CCER y la CCM. Los Resultados se presentan en los artículos científicos publicados o en vías de publicación relacionados con esta Tesis Doctoral y en los que he desempeñado un papel relevante con experimentos, análisis de resultados, escritura de manuscritos, revisión bibliográfica y aporte de ideas. Son los siguientes:

- 1.- **Fernández-Morales JC**, Cortés-Gil L, García AG, de Diego AM. Differences in the quantal release of catecholamines in chromaffin cells of rat embryos and their mothers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 297 (2):C407-418.
- 2.- Vestring S, **Fernández-Morales JC**, Padín JF, Castro-Musial D, Calvo-Gallardo E, García AG, de Diego AM. Distinct contribution of mitochondria to the regulation of calcium signalling and exocytosis in rat embryo and mother chromaffin cells. *En preparación.*

- 3.- **Fernández-Morales JC**, García AG, de Diego AM. Two Steps of the Hypoxia-Induced Catecholamine Secretion from Rat Embryo Chromaffin Cells are Differentially Controlled by High-Voltage Activated Calcium Channel Subtypes. *Neuroscience Letters* 2013; Under review.
- 4.- De Diego AM, **Fernández-Morales JC**, Lorrio S, Díaz ME, García AG. Developmental changes of exocytotic quantal events and vesicle pools in rat chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; Under review.
- 5.- **Fernández-Morales JC**, Padín JF, Maroto M, Vestring S, Calvo-Gallardo E, Castro-Musial D, García AG, De Diego AM. Blockade of High-voltage Activated Calcium Channels Elicited by Nickel, Mibefradil and NNC 55-0396, in Rat Embryo and Bovine Chromaffin Cells. *En preparación*.
- 6.- Maroto M, de Diego AM, Albiñana E, **Fernandez-Morales JC**, Caricati-Neto A, Jurkiewicz A, Yáñez M, Rodríguez-Franco MI, Conde S, Arce MP, Hernández-Guijo JM, García AG. Multi-target novel neuroprotective compound ITH33/IQM9.21 inhibits calcium entry, calcium signals and exocytosis. *Cell Calcium* 2011; 50 (4):359-369.
- 7.- Padín JF, de Diego AM, **Fernández-Morales JC**, Merino C, Maroto M, Calvo-Gallardo E, Arranz JA, Yáñez M, García AG. Resveratrol augments nitric oxide generation and causes store calcium release in chromaffin cells. *Eur J Pharmacol* 2012; 685(1-3):99-107.
- 8.- **Fernández-Morales JC**, Yáñez M, Orallo F, Cortés L, González JC, Hernández-Guijo JM, García AG, de Diego AM. Blockade by nanomolar resveratrol of quantal catecholamine release in chromaffin cells. *Mol Pharmacol* 2010 78(4):734-44.
- 9.- Padín JF, **Fernández-Morales JC**, Olivares R, Vestring S, Pascual R, Arranz-Tagarro JA, Calvo-Gallardo E, Colmena I, Gandía L, García AG. A novel role for the plasmalemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger revealed at physiological temperature: shaping of Ca^{2+} and exocytotic signals during depolarisation of chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013 Under review.
- 10.- **Fernández-Morales JC**, Arranz-Tagarro JA, Calvo-Gallardo E, Maroto M, Padín JF, García AG. Stabilizers of neuronal and mitochondrial calcium cycling as a strategy for developing a medicine for Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci* 2012; 3 (11):873-83.
- 11.- García AG, Padín JF, **Fernández-Morales JC**, Maroto M, García-Sancho J. Cytosolic organelles shape calcium signals and exo-endocytotic responses of chromaffin cells. *Cell Calcium* 2012; 51:309-320.

INTRODUCCIÓN

2.- INTRODUCCIÓN

2.1 *Médula adrenal y células cromafines*

2.1.1 Generalidades

La glándula suprarrenal se ubica anatómicamente en el extremo superior de los riñones y está constituida por dos órganos que coexisten espacialmente pero con marcadas diferencias funcionales y embriológicas: la corteza y la médula suprarrenal (Figura 1.1A,B). En la médula suprarrenal se encuentran las células cromafines que producen y secretan fundamentalmente catecolaminas tales como adrenalina y, en menor medida, su precursor noradrenalina, además de neuropéptidos. Por otro lado, la corteza de la glándula suprarrenal procede del epitelio celónico y por tanto tiene un origen mesodérmico, está compuesta por células fasciculadas, glomerulares y reticuladas que secretan glucocorticoides, mineralocorticoides y una pequeña fracción de hormonas sexuales.

Aparte de sus muchos efectos sobre órganos a distancia, estos esteroides también cumplen una función paracrina sobre la médula adrenal (Bornstein y col., 1997). Su acción está involucrada en la función y en la estructura de las células cromafines, ya que favorece la producción de adrenalina a partir de noradrenalina y evita la formación de prolongaciones en estas células. Es sabido que las células cromafines en cultivo, eventualmente generan procesos de características similares a las neuritas (Trifaró y Lee, 1980; Unsicker y col., 1978), y que la presencia de esteroides al medio de cultivo inhibe este crecimiento (Anderson y Axel, 1986).

La médula adrenal comparte un origen embriológico con el sistema simpático, ya que al igual que éste proviene del neuroectodermo, son células que derivan de la cresta neural, sufren una migración y la posterior diferenciación a células cromafines (Weston, 1970; Aloe y Levi-Montalcini 1979; Tischler, 2002). Algunos de los progenitores neuronales provenientes de la cresta neural originan el sistema simpático, mientras que otros migran e invaden la corteza suprarrenal (Le Douarin y col., 2008) dando lugar a la médula de dicha glándula. Más tarde, como consecuencia de la

actividad de diversos factores de crecimiento (Dutt y col., 2006; Barald, 1982) que estimulan la vía del AMP cíclico, las células se diferencian y se induce la síntesis de catecolaminas (Bilodeau y col., 2000; Bilodeau y col., 2005).

Por su origen y por su ubicación, la médula suprarrenal es considerada un ganglio simpático modificado (Díaz-Flores y col., 2008), y las células cromafines que la componen son variantes neuronales que pueden considerarse neuronas postganglionares del sistema simpático, las cuales pierden sus axones y dendritas durante el desarrollo primario y se convierten en células secretoras liberando sus productos de secreción directamente al torrente sanguíneo actuando así como neurohormonas (Figura 1.1C) (Donald y Sheperd, 1980). Las neuronas postganglionares del sistema nervioso autónomo también producen y secretan catecolaminas, que funcionan como neurotransmisores. Por otro lado, al igual que en un ganglio simpático, las células cromafines son estimuladas por terminales colinérgicas preganglionares del sistema simpático. Las catecolaminas se encuentran localizadas en otras estructuras neuronales como pueden ser la neurona noradrenérgica periférica (Euler, 1946) o la neurona noradrenérgica central (Vogt, 1954).

Todas las células de la médula suprarrenal están inervadas por terminaciones colinérgicas de las neuronas simpáticas preganglionares del nervio esplácnico (Hirano, 1982). Las células se encuentran dispuestas en cordones o aglomerados redondeados, sustentados por una red de fibras reticulares (Díaz-Flores y col., 2008) y rodeadas por una abundante red de vasos sanguíneos, lo cual favorece la relación con los capilares, a los que liberan sus productos de secreción (Figura 1.1C). Las terminaciones axonales del nervio esplácnico liberan acetilcolina sobre las células cromafines, las cuales poseen receptores colinérgicos de membrana que se unen con alta afinidad a este neurotransmisor. Estos receptores se clasifican en dos grupos principales: muscarínicos y nicotínicos.

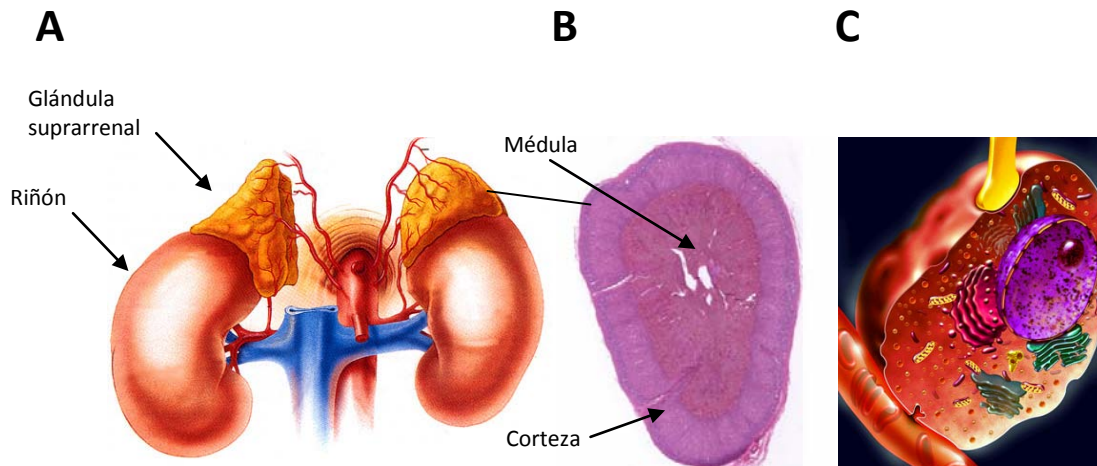


Figura 1.1 - (A) La representación muestra la localización de la glándula suprarrenal y sus relaciones anatómicas con el riñón. (B) En un corte histológico de la glándula suprarrenal se pueden diferenciar la médula y la corteza. (C) Se representa la ultraestructura de una célula cromafín. Nótese el contacto directo de la misma con una terminación nerviosa responsable de su estimulación y con un capilar sanguíneo hacia donde se secretan las catecolaminas mediante exocitosis.

La secreción en las células cromafines es estimulada mayormente por la activación de receptores nicotínicos, que son receptores del tipo ionotrópicos. Sin embargo en estas células también hay receptores muscarínicos metabotrópicos acoplados a proteína G, que pueden contribuir a la regulación de la secreción de catecolaminas (Aguilar, 1992). Dentro de los receptores muscarínicos hay cinco subtipos (M1-M5). En células cromafines bovinas (CCB) se observó mayor proporción del subtipo M2, y en menor proporción los subtipos M1, M3 y M4 (Aguilar y col., 1992; Fernando y col., 1991; Olivos y Artalejo, 2008). En cuanto a los receptores nicotínicos, el subtipo más importante en las células cromafines es el complejo pentamérico formado por las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ que forman el canal que atraviesa la membrana (Sala y col., 2008), a las que también podrían asociarse, para constituir heterómeros más complejos, las subunidades $\alpha 5$ y/o $\beta 2$ (Di Angelantonio y col., 2003; Free y col., 2005).

Cuando el receptor es activado por la acetilcolina liberada desde las terminaciones neuronales este canal aumenta su permeabilidad a cationes, ingresando fundamentalmente Na^+ , despolarizando la membrana plasmática, y generando consecuentemente el disparo de potenciales de acción (PA). A consecuencia de esto se activan canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) en la membrana plasmática, y

se produce la entrada de Ca^{2+} que dispara la exocitosis de las vesículas secretoras que contienen las catecolaminas y otras sustancias activas.

En cuanto a las células cromafines de rata neonata debe resaltarse que expresan receptores nicotínicos, frente a estímulos de hipoxia intermitente (HI) estas células reducen la expresión de estos receptores vía señalización por especies reactivas de oxígeno, resultando en una atenuación de la respuesta de estas células a la nicotina (Souvannakitti D y col., 2010), adquiriendo la nicotina más importancia cuando se establece la secreción de catecolaminas neurogénica en las ratas jóvenes.

La exposición de nicotina en la rata neonata dificulta entonces la respuesta secretora de catecolaminas inducida por hipoxia en células cromafines, proveyendo un enlace entre las madres fumadoras, una respuesta secretora anormal frente al estímulo hipóxico y un incremento en el riesgo de muerte súbita infantil. Las ratas neonatas tratadas con nicotina sufren una sobreexpresión de canales de K^+ sensibles a ATP (K^+_{ATP}) vía estimulación de receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChRs) $\alpha 7$. Estos K^+_{ATP} se abren durante la hipoxia favoreciendo por tanto la hiperpolarización de la membrana celular y la supresión de la entrada de calcio por CCDV (Buttigieg y col., 2009).

Existen evidencias de que en las células cromafines de la rata y del hombre podrían expresarse nAChRs formados por las subunidades $\alpha 2$ (no en el hombre), $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 4$ (Mousavi y col., 2001; Di Angelantonio y col., 2003), mientras que en las CCB las subunidades constituyentes de los nAChRs serían la $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ y $\beta 4$ (Criado y col., 1997; Campos-Caro y col., 1997).

2.1.2 Potencial de membrana y potencial de acción

En todas las células en reposo existe una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior celular, denominado potencial de membrana (V_m) (por convención, $V_{\text{intra}} - V_{\text{extra}}$). Este potencial depende de las concentraciones intracelulares y extracelulares de los diferentes iones y de las conductividades relativas de la membrana plasmática a ellos. En las células no excitables este potencial tiene generalmente valores

entre -10 y -30 mV, mientras que en las excitables es próximo a valores entre -50 y -90 mV. En estudios realizados en los años 60 se estimó un valor para el potencial de reposo en células cromafines de alrededor de -30 mV (Douglas y col., 1967ab; Matthews y col., 1967; Fawcett y col., 1969). Las mejoras en las técnicas experimentales introducidas por la técnica de patch-clamp permitieron estimar este valor entre -50 y -80 mV (Fenwick y col., 1982). En estudios más recientes con registros de patch-clamp en la configuración de parche perforado sobre CCB se registró un valor de -50 mV (Wallace y col., 2002; Orozco y col., 2006).

Al ser excitada fisiológicamente la membrana de la célula cromafin por la acetilcolina liberada de las terminaciones neuronales y unirse a los receptores nicotínicos de acetilcolina estos aumentan la permeabilidad a Na^+ disparándose PA en la membrana plasmática de la célula. La fase de ascenso del PA puede deberse o bien solo a la entrada de Na^+ (Biales y col., 1976) o depender de la entrada de iones Na^+ y Ca^{2+} , (Kidokoro y Ritchie, 1980; Nassar-Gentina y col., 1988; Brandt y col., 1976). La fase de descenso del PA está mediada en células cromafines por la inactivación de los canales de Na^+ (Solaro y col., 1995) además de por la actuación de los canales de K^+ dependientes de voltaje (Inoue y Imanaga, 1993) y de varios subtipos de canales de K^+ activados por Ca^{2+} tipo BK (Solaro y Lingle, 1992; Solaro y col., 1997). Estos canales de K^+ estarían pues regulando la frecuencia de disparo en células cromafines (González-García y col., 1993; Lara y col., 1995; Montiel y col., 1995).

La frecuencia de PA en las células cromafines es controlada por la activación de los receptores nicotínicos. El disparo de PA espontáneos fue estudiado en cultivos de células cromafines de gerbos, humanos, ratas y vacas (Biales y col., 1976; Brandt y col., 1976, Kidokoro y Ritchie 1980, Kidokoro y col., 1982, Zhang y col., 1997, Micheletti y col., 2005; Wallace y col., 2002, de Diego y col., 2008). La frecuencia de aparición de PA espontáneos es muy variable entre especies, siendo variable también entre las diferentes células cromafines de una misma especie; en célula cromafin bovina la mayor frecuencia media de PA espontáneos medidos fue de 0.94 Hz y la menor frecuencia media de PA espontáneos registrados fue de 0,21 Hz (Wallace y col., 2002). Estos PA presentan una amplitud muy variable, con valores de entre 52 mV y 78 mV en célula cromafin bovina (de Diego, 2009).

Las corrientes de Ca^{2+} a través de CCDV que se activan durante un PA son el disparador natural de la exocitosis en las células cromafines, como en otras células neuroendocrinas y en neuronas (Aunis, 1998; Cheek y Barry, 1993; Livett, 1993). La eficiencia de esta corriente de Ca^{2+} para inducir exocitosis varía según el tipo de preparación. La exocitosis generada por un solo PA en rodajas de médula adrenal de ratón es de aproximadamente 7 vesículas, mientras que en células aisladas en cultivo primario se midieron valores inferiores (~ 2 vesículas) (Moser y Neher, 1997; Zhou y Misler, 1995).

El disparo repetitivo de potenciales de acción en célula cromafín de rata (CCR) permite la elevación intracelular del Ca^{2+} , el cual dispara la secreción de catecolaminas (Zhou y col., 1995). Además los patrones específicos de disparo de PA en CCR pueden influenciar la respuesta secretora (Duan y col., 2003) y puede ser regulada fisiológicamente (Lovell y col., 2001; Lovell y col., 2004). Estudios previos han mostrado que en CCR los PA son dependientes de dos variantes específicas de canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia (BK), una variante inactivante (denominada BK_i) y una variante no inactivante (denominada BK_s); así, las CCR exhiben diferentes comportamientos de disparo en respuesta a la inyección de corriente (Solaro y col., 1995; Lingle y col., 1996). En CCR los canales de K^+ de tipo inactivante BK_i y no inactivante BK_s contribuyen diferencialmente al desarrollo de disparo de los PA; la corriente BK influye en la rápida hiperpolarización y en la post-hiperpolarización de los PA aislados; la corriente de tipo inactivante BK_i facilita el disparo repetitivo de PA mientras que la corriente de tipo no inactivante BK_s no lo hace.

El conjunto completo de las conductancias iónicas de CCR que han sido identificadas incluiría: una conductancia de K^+ en goteo mediada por canales tipo TASK-1 (Inoue y col., 2008), corriente de Na^+ dependientes de voltaje (Wada y col., 2008), corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Prakriya y col., 1999), corrientes de K^+ dependientes de voltaje (Conforti y Millhorn, 1997), corrientes de K^+ dependientes de voltaje y oxígeno (Conforti y col., 2000), corrientes de K^+ de tipo SK dependientes de Ca^{2+} de baja conductancia (Neely y Lingle, 1992; Park, 1994) y como mencionamos anteriormente dos tipos distintos de corrientes de K^+ de tipo BK (Solaro, y col., 1995; Ding y col., 1998).

2.1.3 Vesícula de secreción en células cromafines

El producto de secreción más importante de las células cromafines es la adrenalina, la cual pertenece a un grupo de sustancias, las catecolaminas, que incluye también a la dopamina y a la noradrenalina. Estos compuestos, las catecolaminas, están formados a partir de **fenilalanina** y tirosina (que son incorporados en la dieta). La **tirosina** además es producida en el hígado al hidroxilarse la fenilalanina a través de la acción de la fenilalanina-hidroxilasa (Figura 1.2). La **tirosina** circulante por el torrente sanguíneo es transportada a neuronas secretoras de catecolaminas y células cromafines donde es transformada en el citoplasma de las células cromafines en **DOPA** (3,4 dihidroxifenilalanina) por la tirosina-hidroxilasa, paso limitante en la ruta biosintética bajo el control inhibitorio de la propia adrenalina y noradrenalina y estimulado por la hormona adrenocorticotropa (ACTH).

La DOPA se transforma en **dopamina** por acción de la DOPA-descarboxilasa (Figura 1.2). El paso de dopamina a **noradrenalina** lo cataliza la enzima dopamina β -hidroxilasa, a partir de ascorbato y oxígeno; y en el último paso, la transformación de noradrenalina en **adrenalina** es llevada a cabo por la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa. Toda la adrenalina circulante procede de la secreción de la médula suprarrenal, la cual genera una concentración en sangre basal de 97 pg/mL (de Diego y col., 2008b). En cambio, la noradrenalina es también producida y secretada por neuronas del sistema nervioso autónomo, donde funciona como neurotransmisor (Purves y col., 2004). Prácticamente toda la noradrenalina circulante deriva de las terminaciones nerviosas simpáticas y del encéfalo donde no sufrió recaptación local en las hendiduras sinápticas. La poca noradrenalina producida por la médula suprarrenal y liberada a la sangre tiene una vida media muy breve porque se destruye en el hígado poco después de su liberación (Donald y Shepherd, 1980).

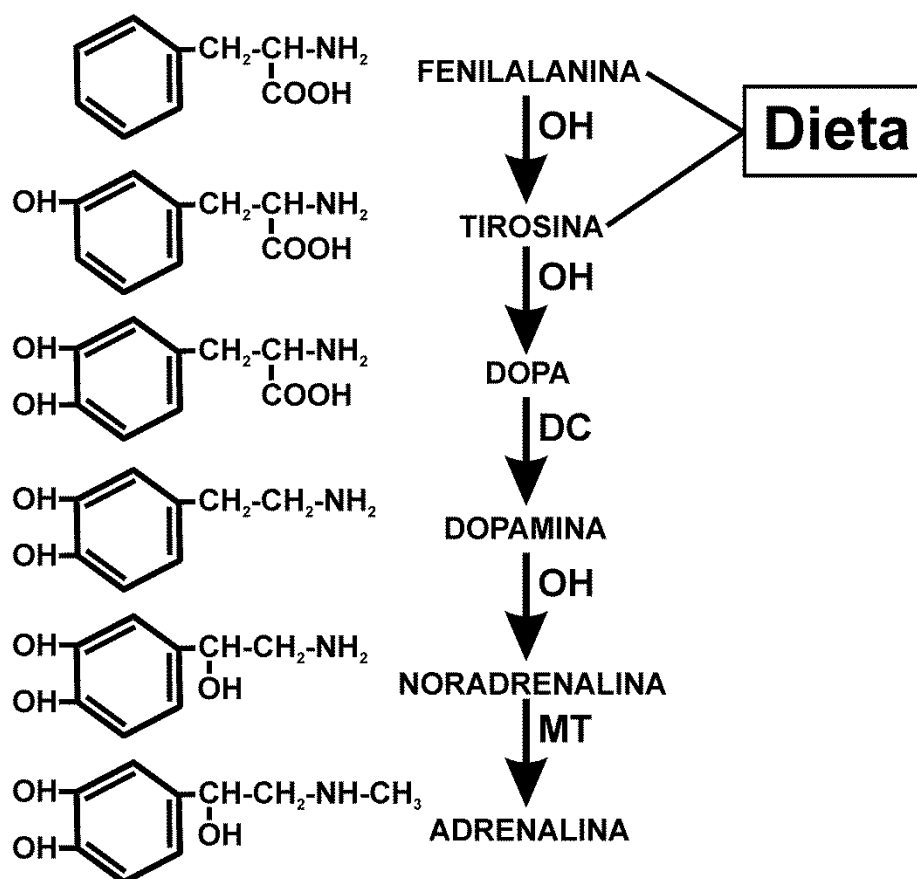


Figura 1.2 – Síntesis de las catecolaminas. En la parte izquierda de la figura se representa la variación en la estructura química de la catecolamina durante su metabolismo, en la parte de la derecha se representa la cadena metabólica de síntesis, con las reacciones enzimáticas codificadas como: OH (hidroxilación), DC (descarboxilación), MT (metil transferencia). Elaboración propia.

Las catecolaminas producidas en las células cromafines se acumulan dentro de estructuras membranosas denominadas vesículas por medio del transportador de monoaminas (Erickson y col., 1996) que utiliza el gradiente de H^+ generado por una bomba H^+ -ATPasa (Dean y col., 1986). Es este un transporte activo secundario que opera en contra de gradiente para lograr almacenar las catecolaminas que se encuentran en el citosol dentro de las vesículas cromafines. Existen dos tipos de transportadores de monoaminas, llamados VMAT1 y VMAT2 (del inglés “vesicular monoamine transporter”), y las células cromafines expresan ambos (Erickson y col., 1996). Los VMAT son antiportadores que trabajan gracias al gradiente de H^+ generado por la bomba H^+ -ATPasa, esta bomba acumula H^+ en el interior vesicular, en contra de gradiente y con gasto de ATP, el transporte hacia el interior de las monoaminas por los

VMAT es acoplado con la salida de dos H^+ desde la vesícula hacia el citosol. El pH de las vesículas cromafines es ácido, con un valor aproximado de 5.5.

Existen diferentes tipos de vesículas en las células cromafines: Unas vesículas secretoras grandes de aproximadamente 200 nm de diámetro, electrodensas, que contienen las catecolaminas y otros componentes; y otras vesículas pequeñas (~40 nm) de baja densidad, similares a las vesículas sinápticas (Annaert y col., 1993; Tanner y col., 1996; Koval y col., 2001). Por medio de microscopía electrónica se estimó que el número medio de vesículas secretoras por célula que contienen adrenalina es de aproximadamente 17.000, que se corresponde con el 71% del total de vesículas secretoras electrodensas, mientras que las vesículas que contienen noradrenalina se estiman en 7000 (Vitale y col., 1995).

Existen muchas pruebas que indican que la adrenalina y la noradrenalina son secretadas por diferentes poblaciones de células de la medula adrenal (Coupland, 1965). Las células que secretan adrenalina poseen vesículas más pequeñas, que presentan generalmente una forma redondeada, y de contenido menos electrodenso, que no llena por completo la vesícula y que está rodeada por un halo poco electrodenso situado bajo la membrana (Figura 1.3a). Las células cromafines que secretan noradrenalina tienen vesículas más grandes que adoptan formas más variables, y están provistas de un contenido más sólido, electrodenso y homogéneo (Figura 1.3b) (Crivellato y col., 2008).

Además de las mencionadas catecolaminas, las vesículas secretoras contienen ATP, serotonina, neurotensina, sustancia P, somatostatina, proteínas como las cromograninas A y B (Banks y Helle, 1965; O'Connor y Frigon, 1984), péptidos menores como el neuropéptido Y, péptidos similares a los opiáceos, las encefalinas (Lewis y col., 1979; Viveros y col., 1979) y dopamina β -hidroxilasa. La formación de las vesículas secretoras no se conoce con profundidad; sí se sabe que se producen en la red del trans-Golgi (TGN, Trans-Golgi Network en inglés), una red de estructuras tubulares y cisternas que forman parte del aparato de Golgi (Crivellato y col., 2008). Las proteínas acídicas cromograninas confieren el carácter electrodenso a la vesículas, son necesarias para la misma formación de las vesículas secretoras ya que actúan como proteína de unión con las moléculas de catecolaminas (Stettler y col.,

2009) contribuyendo al empaquetamiento y estabilización de las mismas junto con cationes que neutralizan sus cargas.

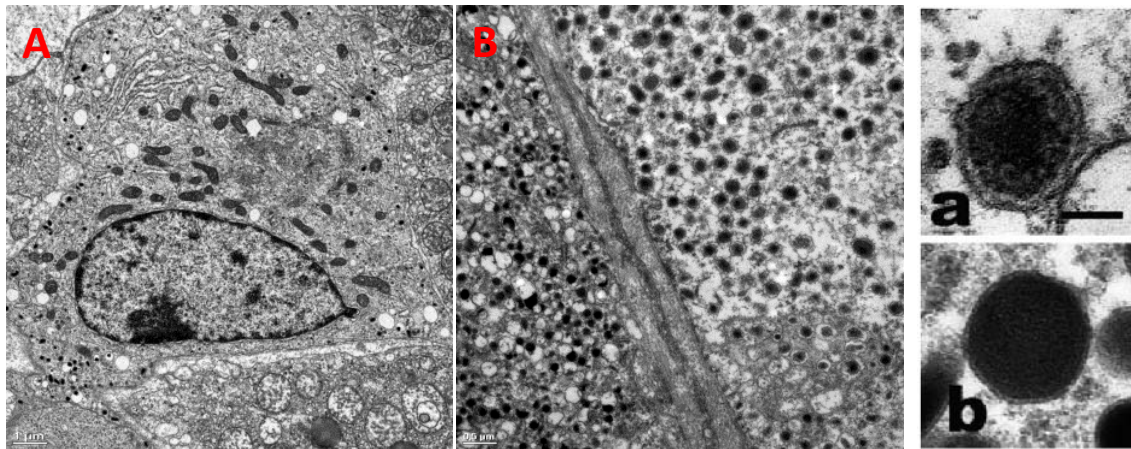


Figura 1.3 - Microscopia electrónica de células cromafines (A) En esta micrografía se observa la ubicación de unas pocas vesículas secretoras cerca de la membrana plasmática en una célula cromafín embrionaria de rata (datos propios). (B) En esta otra micrografía de célula cromafín de rata adulta (madre) podemos ver multitud de vesículas cromafines alrededor del citoplasma, vesículas adrenérgicas con halo en la periferia y contenido granular moderadamente electrodensó (datos propios). Se observan las diferencias entre las vesículas de células cromafines de ratón cargadas con adrenalina de las cargadas con noradrenalina. (a) Las vesículas que contienen adrenalina muestran un halo en su periferia, con un contenido granular fino y moderadamente electrodensó, mientras que las que contienen noradrenalina (b) presentan un contenido sólido y altamente electrodensó. Imágenes tomadas de E. Crivellato y col., (2008).

2.1.4 La médula adrenal y el tono simpático

El sistema nervioso autónomo es fundamentalmente un sistema eferente e involuntario que transmite impulsos desde el sistema nervioso central (desde centros nerviosos situados en la médula espinal, tronco cerebral e hipotálamo) hasta la periferia, estimulando determinados órganos. Estas acciones incluyen, el control de la frecuencia y la fuerza de contracción cardíaca, la contracción y relajación de vasos sanguíneos, la contracción y dilatación del músculo liso en varios órganos, la acomodación visual, el tamaño pupilar y la secreción de glándulas exocrinas y endocrinas, regulando funciones tan importantes como la digestión, la circulación sanguínea, la respiración y el metabolismo (Purves y LaMantia, 2004).

El sistema nervioso autónomo se divide funcionalmente en sistema simpático y en sistema parasimpático. El sistema simpático juega un papel fundamental en la

conservación íntegra del organismo, ya que genera una respuesta rápida y efectiva ante los estímulos externos y/o internos que puedan amenazar la integridad del individuo. De esta manera responde a diferentes fuentes de estrés, manteniendo la homeostasia del organismo. Mientras tanto, la acción del sistema parasimpático es generalmente opuesta al simpático, y su función está orientada a la conservación de la energía del organismo (Purves y col., 2004).

En el sistema simpático, las fibras preganglionares salen desde la médula espinal y llegan a una serie de ganglios intermedios, desde donde parten las fibras postganglionares que se dirigen al órgano efector. La innervación de la glándula adrenal es una excepción, ya que las fibras preganglionares inervan directamente a la glándula suprarrenal, que sería como ya dijimos previamente un ganglio simpático modificado. El neurotransmisor involucrado en estas sinapsis ganglionares es la acetilcolina; por otro lado el neurotransmisor que es liberado en las sinapsis que se establecen entre las fibras postganglionares y el órgano efector es la noradrenalina (Purves y col., 2004). En la médula adrenal, como ya dijimos, la noradrenalina es mayoritariamente convertida a adrenalina por la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa, y los productos de secreción son liberados a la sangre.

Tanto el sistema nervioso simpático como el parasimpático mantienen una actividad constante que se conoce como *tono simpático* y *tono parasimpático*. Ello permite que en un momento dado, la actividad de cada uno de estos dos sistemas pueda aumentar o disminuir. El *tono simpático* mantiene en condiciones normales a casi todos los vasos sanguíneos constreñidos hasta aproximadamente la mitad de su diámetro máximo. Si aumenta la actividad simpática se produciría una constricción adicional de los vasos sanguíneos, y en cambio si hay una disminución de la actividad simpática se produciría una vasodilatación. Si no existiera *tono simpático* solo podría producirse vasoconstricción, pues el vaso estaría dilatado por completo.

En condiciones normales en las cuales el organismo no está sometido a estrés, las neuronas preganglionares simpáticas del nervio esplácnico disparan a frecuencias bajas (*tono simpático*), manteniendo la frecuencia de PA en las células cromafines en aproximadamente 0.5 Hz. A este estado se lo denomina en inglés “*breed and feed*” o

“*rest and digest*”. En estas condiciones las células cromafines liberan pequeñas cantidades de catecolaminas al sistema circulatorio, que permiten que los parámetros fisiológicos (como por ejemplo el tono vascular y la frecuencia cardíaca) se mantengan en sus niveles de reposo.

En condiciones de estrés agudo, el sistema nervioso simpático puede activarse de forma masiva; esto ocurre cuando el hipotálamo es activado por un determinado evento como un estímulo doloroso o emocional muy intenso (la ira, el miedo, la ansiedad, los traumatismos, el dolor agudo, la hipovolemia, la anoxia, la hipotermia, la hipoglucemia, el ejercicio físico intenso, la incertidumbre, los conflictos sociales, las pruebas de competitividad y la tensión psíquica) o un estímulo de amenaza o de percepción de peligro como por ejemplo el ataque de un depredador; en consecuencia se produce una reacción generalizada en todo el organismo, conocida como reacción de alarma o estrés, también denominada de “*lucha o huida*” (en inglés *fight or flight*), en la cual la médula suprarrenal es activada simultáneamente con la rama simpática del sistema nervioso autónomo y actúa en forma sinérgica con éste.

Con la descarga simpática masiva el organismo se pone en marcha para llevar a cabo una actividad muscular enérgica; aumenta la presión arterial, aumenta el flujo sanguíneo en los músculos activos y se disminuye en los órganos innecesarios para garantizar una actividad rápida, se incrementa de forma generalizada el metabolismo celular, la fuerza muscular y la actividad cerebral. La activación de la médula adrenal produce un aumento en la frecuencia de disparo de PA en las células cromafines hasta un valor 30 veces superior al de reposo (~15Hz) (Iijima y col., 1992), lo cual genera una liberación masiva de adrenalina (en mayor medida) y noradrenalina (en menor medida) a la circulación general. Las catecolaminas llegan a los órganos diana por mediación de la sangre y su efecto se suma al de la noradrenalina liberada desde las terminaciones simpáticas, contribuyendo así a la activación de receptores adrenérgicos.

Los receptores adrenérgicos se clasifican en receptores alfa (α) y beta (β) dependiendo del orden de potencia con la que se afectan por los agonistas y antagonistas del sistema nervioso simpático. Los receptores α son aquellos que se estimulan sobre todo por la acción de la noradrenalina y fenilefrina, mientras que los receptores β son

los que se estimulan sobre todo con la adrenalina o el isoprotenerol. Existe además otro receptor periférico adrenérgico específico para la dopamina, el receptor dopaminérgico (DA). Los adrenorreceptores se localizan tanto en la neurona presináptica como en la postsináptica, así como también en localizaciones extrasinápticas.

Los receptores α adrenérgicos se subdividen en α_1 y α_2 en función de su respuesta a los antagonistas yohimbina y prazosina. La prazosina es el antagonista más potente de los α_1 y la yohimbina es el antagonista más potente de los α_2 . Los receptores α_1 son postsinápticos y se encuentran en la musculatura lisa de los vasos sanguíneos, gastrointestinal, útero, trigono vesical y piel (músculo piloerector). Su activación comporta un aumento o una disminución del tono muscular dependiendo del órgano efector produciendo contracción del musculo liso, excepto en el sistema gastrointestinal donde provoca relajación. Los receptores adrenérgicos α_2 son de localización presináptica y postsináptica, se encuentran en una gran variedad de órganos aparte del sistema nervioso central y periférico, como plaquetas, hígado, riñones, tejido adiposo y páncreas, con funciones fisiológicas bien definidas en cada órgano. Existen tres subtipos bien identificados: α_2A , α_2B y α_2C .

La interacción de la adrenalina con los receptores α determina esencialmente un aumento citosólico de Ca^{2+} , mientras que la unión con los receptores β incrementa los niveles de AMPc. Los receptores adrenérgicos α están acoplados a proteínas Gs estimuladoras; median la contracción de la musculatura lisa de muchos tejidos activando la vía de segundos mensajeros IP_3 , DG y Ca^{2+} mediante la activación de la fosfolipasa C. Los receptores adrenérgicos α_2 están acoplados a una proteína G inhibidora y producen inhibición de la liberación de noradrenalina, mediada por el descenso de actividad de la adenilato ciclasa (AC), y la consiguiente disminución de la concentración citosólica de AMPc. Los receptores adrenérgicos β_1 están acoplados a una proteína Gs estimuladora y desencadenan la contracción del musculo cardíaco y la liberación de ácidos grasos. La acción se realiza mediante la activación de la AC y el correspondiente incremento de la concentración citosólica de AMPc. La unión a los receptores adrenérgicos β_1 produce broncodilatación y vasodilatación, actuando de igual forma por medio de una proteína Gs estimuladora que activa la AC y elevan los niveles de AMPc.

2.1.5 La célula cromafín embrionaria y la adaptación fetal al nacimiento

La liberación de catecolaminas de la médula adrenal es una reacción fisiológica que acontece fundamentalmente en situaciones de estrés. Esta respuesta secretora es crítica en el feto y en el neonato para accionar los cambios cardiovasculares (se estimula la actividad cardíaca), respiratorios y metabólicos que son necesarios para la rápida adaptación a la vida extrauterina, mejorando en definitiva la tolerancia del feto al parto (Comline y Silver, 1966; Lagercrantz y Bistoletti, 1977; Jones, 1980; Faxelius y col., 1983, 1984; Slotkin y Seidler, 1988). La innervación de la médula adrenal en mamíferos se completa totalmente durante la vida postnatal en la rata después de aproximadamente la primera semana de vida (Seidler y Slotkin, 1985; Seidler y Slotkin, 1986).

Por lo tanto, para mantener la actividad adrenérgica necesaria en el momento del nacimiento, la glándula adrenal inmadura debe poseer mecanismos secretores no-neurogénicos especializados que promuevan la liberación de catecolaminas en ausencia de innervación. De hecho, la existencia de una respuesta secretora no neurogénica a hipoxia, en glándulas adrenales de ratas neonatas, se sugirió por primera vez por Seidler y Slotkin, (1985, 1986). Así, las células cromafines neonatas se comportan como sensores de O_2 que liberan catecolaminas en respuesta a disminuciones locales de la tensión parcial de O_2 (Mojet y col., 1997; Thompson y col., 1997; García-Fernández y col., 2007). De forma similar a lo que ocurre con las células glomerulares del cuerpo carotídeo (López-Barneo y col., 2001) las células cromafines embrionarias y perinatales contienen canales de K^+ sensibles a O_2 (Thompson y col., 1997; Rychkov y col., 1998; Keating y col., 2001). El estrés hipóxico inhibiría estos canales siendo la señal que inicia la despolarización celular y la subsiguiente entrada de Ca^{2+} por los CCDVs disparando la secreción de catecolaminas.

Poco se sabe sobre la participación de los distintos subtipos de CCDV en la respuesta secretora a hipoxia; sobre células cromafines embrionarias de rata (CCER) algunos autores han puesto de manifiesto que los CCDV de bajo umbral de activación (canales tipo T) son incapaces de producir exocitosis frente a los CCDV de alto umbral que si lo son (Bournaud y col., 2001). Asimismo se ha visto que el bloqueante de los CCDV de alto umbral de activación de tipo L (nimodipino) inhibe la respuesta secretora

a hipoxia en células cromafines de medula adrenal de rata neonata (Thompson y col., 1997). En glándulas adrenales de feto de oveja, otro bloqueante de los CCDV de tipo L (nifedipino) abole la respuesta secretora a hipoxia (Adams y col., 1996). En la actualidad se han publicado varios trabajos que enfatizan la contribución del CCDV de tipo T en la respuesta secretora a hipoxia (Carabelli y col., 2007; Carbone y col., 2006; Levitsky y López-Barneo, 2009).

La exposición del feto a episodios de asfixia durante el nacimiento resulta en una gran variedad de cambios adaptativos; en la iniciación y regulación de los mismos la liberación de catecolaminas de la médula adrenal juega un importante papel en la supervivencia a este estrés hipóxico (Lagercrantz y Bistoletti, 1977; Lagercrantz y Slotkin, 1986; Yuan y col., 1997; Lagercrantz y col., 2001); durante el parto se secretan grandes cantidades de catecolaminas al torrente sanguíneo del feto, jugando un importantísimo papel en el inicio de la respiración; estas catecolaminas inducen un cambio del endotelio pulmonar del feto, que pasa de un estado de secreción neta de fluidos a un estado de absorción neta de fluidos (Olver y Walters, 1977; Walters y Olver, 1978; Brown y col., 1983; Olver y col., 1986), produciéndose así la reabsorción de fluidos en los pulmones y la secreción de surfactante en los mismos, que facilita la respiración de aire para así mejorar la actividad cardíaca (Slotkin y Seidler, 1988).

Estas respuestas fisiológicas dependen críticamente de la secreción de catecolaminas de las células cromafines de la médula adrenal, especialmente adrenalina, que es accionada por factores de estrés como una baja presión parcial de O₂ (hipoxia), elevado CO₂ (hipercapnia), bajo pH (acidosis) y alto pH (alcalosis) —Fernández-Morales y col., 2013, en preparación—. Las células cromafines de la médula adrenal de neonatos expresan un mecanismo de sensibilidad directa a la hipoxia, independiente del sistema nervioso, que se pierde o suprime postnatalmente a lo largo de un espacio de tiempo en el que acontece de forma aproximadamente paralela la maduración de la innervación colinérgica del nervio esplácnico hacia la medula adrenal (Seidler y Slotkin, 1985; Seidler y Slotkin, 1986; Lagercrantz and Slotkin, 1986; Slotkin y Seidler, 1988).

Durante el parto y en los momentos subsiguientes al mismo se ha observado que de forma simultánea a la caída de la presión parcial de O₂ en el feto acontece un

incremento en la tensión sanguínea de CO₂; por tanto la hipercapnia, como ya mencionamos anteriormente, puede estimular la liberación de catecolaminas de la médula adrenal. Se sabe que la hipercapnia es un potente estímulo para algunas neuronas del Sistema Nervioso Central (Putnam y col., 2004) y para las células quimiorreceptoras periféricas del cuerpo carotídeo (Iturriaga y col., 1991; Rocher y col., 1991; Buckler y Vaughan-Jones, 1994). El hecho de que la molécula de CO₂ pueda estimular directamente la secreción de catecolaminas en células cromafines de la médula adrenal no ha sido muy estudiado hasta la fecha.

Cross y Silver (1962) mostraron que la hipercapnia severa *in vivo* es un estímulo potente para liberar catecolaminas de la médula adrenal de ratas adultas. Por otra parte, Biesold y col., (1989) descubrieron que la denervación esplácnica de ratas adultas inhibía la respuesta secretora evocada por hipercapnia. En médula adrenal de rata adulta se ha visto que la acidosis hipercápnica y pH extracelulares ácidos incrementan la liberación de catecolaminas (Fujiwara y col., 1994). En cuanto a estudios con animales perinatales, en fetos de oveja se ha encontrado que la acidosis potencia la liberación de catecolaminas de la médula adrenal en respuesta a hipoxia (Lewis y col., 1987), mientras que otros autores no observan liberación de catecolaminas en respuesta a la acidosis metabólica (Cohn y col., 1997).

Un par de trabajos ponen de manifiesto que las células cromafines de la médula adrenal de rata neonata son sensores de CO₂ y secretan catecolaminas en respuesta a incrementos locales y graduales de la presión parcial de CO₂. Se ha visto que las rodajas de médula adrenal de rata neonata responden a hipercapnia liberando catecolaminas de una forma mucho mayor que las rodajas de médula adrenal de rata adulta (Muñoz-cabello y col., 2005). Estos incrementos de CO₂ producen la despolarización celular, un incremento en el disparo de potenciales de acción y la posterior entrada de Ca²⁺ (Muñoz-cabello y col., 2005); la entrada de Ca²⁺ por CCDV no ha sido todavía estudiada. Estos efectos de la hipercapnia son independientes de la acidificación extracelular pero sí que van acompañados de una caída del pH intracelular.

En otro estudio estos autores vieron en médulas adrenales de rata neonata, que una asociación entre acidosis hipercápnica e hipoxia reproducía fielmente los episodios

de asfixia que ocurren durante el parto; se observó una más que aditiva respuesta secretora en la médula adrenal de rata neonata, poniendo de manifiesto un efecto de sinergia entre ambos estímulos que conducen a una respuesta secretora mucho más potente (Rico y col., 2005). Los animales neonatos y los fetos rara vez experimentan hipoxia exclusivamente (por ejemplo a grandes altitudes); es más común una asociación del estímulo de hipoxia con la acidosis hipercápnica.

Estos descubrimientos planteaban la posibilidad de que la activación de los nAChR de las células cromafines pudieran estar involucrados en la pérdida postnatal de las propiedades directas de quimiosensibilidad al O₂ en estas células. En realidad, se sabe que la exposición a nicotina durante la vida prenatal causa una pérdida de la tolerancia a la hipoxia, disminuyendo la sensibilidad a hipoxia en el neonato y reduciendo la secreción de catecolaminas inducida por este estímulo (Slotkin y col., 1995; Slotkin y col., 1998; Cohen y col., 2005). Más recientemente se ha demostrado que la aplicación de nicotina crónica tanto *in utero* como *in vitro*, resultó en una pérdida de la sensibilidad directa a hipoxia en células cromafines de médula adrenal de ratas perinatales (Buttigieg y col., 2008) y como ésta pérdida de sensibilidad a hipoxia por la nicotina vendría mediada por una sobreexpresión de canales de K⁺ sensibles a ATP, debido a la activación de nAChR del tipo $\alpha 7$ por la nicotina y a una posterior cascada de señalización mediada por proteínas cinasas (Buttigieg y col., 2009).

Algunos estudios clínicos sugieren que el hecho de fumar asiduamente por parte de las madres es uno de los mayores factores de riesgo para que el feto sufra el síndrome de muerte súbita infantil (SIDS del inglés Sudden Infant Death Syndrome); así, la nicotina presente en la sangre de la madre eliminaría la sensibilidad al estrés hipóxico en el feto, por lo que estaría desprovisto de los mecanismos necesarios para responder al estrés del parto y sería incapaz de llevar a cabo los cambios necesarios para adaptarse a la vida extrauterina (Carbone y Carabelli, 2009).

2.1.6 Sensibilidad a oxígeno en la etapa perinatal: La célula cromafín como sensor de oxígeno

La disponibilidad de una adecuada oxigenación de los tejidos es vital para la supervivencia de todos los mamíferos. Una de las funciones principales del oxígeno es la de servir como aceptor de electrones en la cadena de transporte de electrones, por lo que es una molécula vital en la fosforilación oxidativa de la adenosina difosfato (ADP) a adenosina trifosfato (ATP). Los mamíferos adultos adquieren el suministro necesario de oxígeno a través de la sangre por medio del sistema respiratorio, oxígeno que es entregado a todos los tejidos gracias al sistema circulatorio. En fetos de animales, la circulación materna cede oxígeno al feto por medio de una transferencia de gases a través de la placenta. Normalmente los niveles de oxígeno son mantenidos dentro de unos límites estrictos, incluso durante periodos de una gran demanda (ejercicio intenso). Un nivel normal de presión parcial de oxígeno (PO_2) arterial en individuos adultos se sitúa en aproximadamente 105 mmHg. Debido a las restricciones de difusión del oxígeno que existen en el feto la PO_2 normal se reduce en este hasta los 30 mmHg, un nivel bajo pero adecuado y suficiente para proporcionar al feto la oxigenación necesaria para su desarrollo (Guyton, 1991).

Los fetos de mamíferos han desarrollado varias estrategias que les permitan incrementar el nivel de oxígeno que distribuyen a los tejidos. Una de ellas es la expresión de hemoglobina fetal que desplaza hacia la izquierda la curva de disociación O_2 -hemoglobina y permite que la sangre del feto pueda transportar entre un 20-30% más oxígeno que en el adulto. La concentración de hemoglobina fetal por glóbulo rojo es aproximadamente un 50% más grande que en el adulto. Finalmente hemos de señalar el *efecto Bohr*, el cual describe la relación inversa entre el O_2 y el CO_2 uniéndose a la hemoglobina en los individuos adultos; este efecto es revertido en el feto, por tanto la sangre fetal puede transportar más oxígeno a concentraciones de CO_2 mayores (Guyton, 1991).

En animales mamíferos adultos se han estudiado una serie de eventos que mantienen los niveles de PO_2 en la sangre. La PO_2 es medida por quimiorreceptores estratégicos localizados periféricamente, de los cuales los mejores caracterizados son las

células glomerulares tipo 1 del cuerpo carotídeo (González y col., 1994; López-Barneo y col., 2006). En los neonatos sin embargo la función de la célula glomerular del cuerpo carotídeo esta todavía inmadura y se ve repentinamente sometida a funcionar con tensiones de oxígeno mayores como las presentes en el ambiente extrauterino (González y col., 1994; Wasiko y col., 1999). Además la innervación simpática de órganos diana, como la glándula adrenal y el corazón, es relativamente inmadura en algunas especies, como por ejemplo la rata y el humano (Lagercrantz y Slotkin, 1986). Por lo tanto hay un serio problema para el neonato, y es que los mecanismos normales para mantener la homeostasia de la PO_2 no están desarrollados; pero a pesar de todo ha de responder apropiadamente al estrés hipóxico, como frecuentemente ocurre durante el nacimiento y en la apnea extrauterina. En la actualidad cada vez son más los estudios que sitúan a las células cromafines de la médula adrenal como los sensores de oxígeno que preparan al neonato para la vida extrauterina.

West y col. (1953) sugirieron el primer papel fisiológico para el tejido cromafín fetal cuando propusieron que la elevada concentración de catecolaminas procedentes de la médula adrenal embrionaria cumplía las funciones esenciales destinadas a mantener la presión sanguínea fetal y la correcta circulación sanguínea. En experimentos posteriores se confirmó que la noradrenalina liberada de células cromafines de médula adrenal fetal y de células extracromafines del *órgano de Zuckerkandl* puede redistribuir el flujo de sangre en el cordero hacia el cerebro, corazón y glándula adrenal a expensas de otros órganos vitales (Campbell y col., 1967b, a). Además, Seidler y Slotkin (1985) demostraron que la liberación de adrenalina durante el estímulo hipóxico tenía un papel vital en la supervivencia de las ratas neonatas.

Estos estudios demuestran que las células cromafines embrionarias de médula adrenal, en ausencia de una innervación esplácnica madura, son capaces de detectar cambios en los niveles arteriales de oxígeno, a los que dan respuesta con la secreción de catecolaminas para realizar así los ajustes fisiológicos apropiados en respuesta al estrés hipóxico. El papel directo de las células cromafines de la médula adrenal embrionaria en la percepción de los cambios de la PO_2 fue sugerido por primera vez por Comline y Silver (1961), quienes mostraron que el contenido de catecolaminas de glándulas adrenales de corderos fetales y neonatos se veía fuertemente incrementado en

comparación con individuos adultos. Este progresivo incremento en la liberación de catecolaminas durante la maduración fetal además estaba acompañado por un cambio cualitativo de noradrenalina a adrenalina en el contenido de la médula adrenal.

Por otra parte, los estudios en niños que habían experimentado partos complicados al nacer de nalgas y sufrir asfixia fetal, revelaba una depleción del contenido de catecolaminas en la médula adrenal (Lagercrantz y Bistoletti, 1973), sugiriendo una respuesta directa de las células cromafines de la médula adrenal fetal a hipoxia en humanos. Otros estudios habían mostrado que las células cromafines de médula adrenal de rata neonata liberan catecolaminas durante la exposición al estímulo de hipoxia (Seidler and Slotkin, 1985). Sin embargo, después de la maduración de la innervación esplácnica de la médula adrenal, la liberación de catecolaminas evocada por hipoxia empieza a ser dependiente de la activación del nervio esplácnico. Esto ha sido observado en glándulas adrenales de rata (Seidler and Slotkin, 1985; 1986), oveja (Jones y col., 1988; Cheung, 1990; Rychkov y col., 1998) y bovino (Dry y col., 1991). Todos estos estudios sugieren que las células cromafines de médula adrenal han desarrollado durante la etapa embrionaria y perinatal un mecanismo regulador para percibir la caída en la PO_2 arterial (hipoxia).

2.2 Papel del calcio en las células cromafines

2.2.1 El ion Ca^{2+} como mensajero intracelular

El calcio (del latín *calx*, *calis*, cal) fue descubierto en 1808 por Humphry Davy mediante electrólisis de una amalgama de mercurio y cal; con posterioridad Bunsen en 1854 y Matthiessen en 1856 obtuvieron el metal por electrólisis del cloruro de calcio, y Henri Moissan obtuvo calcio con una pureza del 99% por electrólisis del yoduro. A principios del siglo XX el calcio (Ca) se obtenía de manera rutinaria en los laboratorios. El Ca es un metal alcalinotérreo y es el quinto elemento en mayor abundancia en la corteza terrestre (supondría hasta un 3.6% de su peso); por ello no ha pasado inadvertido a los sistemas biológicos y podría decirse que el calcio es uno de los elementos más importantes para la vida.

En la actualidad está claramente establecido que el ión calcio tiene una función como segundo mensajero en células eucarióticas y que actúa como tal en numerosos tipos celulares, estando implicado en una enorme variedad de procesos celulares en respuesta a estímulos. El papel que juega el Ca^{2+} en la iniciación y mantenimiento de la actividad contráctil cardíaca se descubrió ya hace cien años por Sidney Ringer ; actualmente nadie duda de la importancia vital de este ión no solo en procesos de acoplamiento excitación-contracción, sino también en muchos otros procesos biológicos de muchos sistemas celulares diferentes: Acoplamiento excitación-secreción en neuronas y células endocrinas, comunicación celular, movimiento intracelular de moléculas, modulación del intercambio de otros iones a través de membranas, activación enzimática, motilidad celular, agregación plaquetaria, división celular, tumorigénesis, diferenciación, migración y muerte celular.

El Ca^{2+} en forma libre está presente en el citosol a concentraciones muy bajas, inferiores a $1\ \mu\text{M}$ y modula muchas actividades intracelulares a través de su unión a proteínas de unión a Ca^{2+} tipo calmodulina; de esta forma estimula a la fosfodiesterasa y a diversas cinasas de proteínas que intervienen en los mecanismos de transporte activo, contracción muscular, metabolismo de los hidratos de carbono, etc. El Ca^{2+} actúa como modulador o segundo mensajero para algunas hormonas. El Ca^{2+} es esencial para el funcionamiento de órganos aislados, en especial el corazón, es inotrópico positivo, potencia los efectos de los cardiotónicos y antagoniza la depresión cardíaca inducida por el potasio y el magnesio; es vasodilatador, amortigua el peristaltismo intestinal, es indispensable para la coagulación sanguínea, interviene en la fosforilación oxidativa mitocondrial, y tanto el exceso como el déficit de Ca^{2+} desacoplan la fosforilación oxidativa mitocondrial.

En células eucariotas, el Ca^{2+} se comporta como un segundo mensajero del que se conoce muy bien su papel en la transducción de señales generadas por estímulos ambientales y hormonas (Campbell, 1983). Pero el papel del ión Ca^{2+} no es solo exclusivo de la célula eucariota; en procariotas el estudio del Ca^{2+} como señalizador no ha sido investigado tan profundamente, y de hecho hasta hace muy pocos años sólo se conocía un conjunto de procesos celulares en los cuales se había descrito un requerimiento de calcio; el calcio fue estudiado por primera vez en procariotas hace más

de 50 años (Norris y Jensen, 1957). Desde entonces se le ha implicado en un amplio rango de procesos fisiológicos en procariotas entre los que se incluyen algunos como la quimiotaxis y motilidad (Tisa y Adler, 1992, 1995; Watkins y col., 1995; Pitta y col., 1997), patogénesis (Rose y col., 1993; Straley y col., 1993), el ciclo celular y el control del inicio de la replicación (Yu y Margolin, 1997), el *quorum sensing* (detección de quórum o percepción de la densidad celular) (Werthen y Lundgren, 2001), en la diferenciación de heterocistos (Torrecilla y col., 2004) y en respuesta a choques térmicos de frío y calor (Torrecilla y col., 2000).

Este papel de segundo mensajero que posee el calcio es plausible gracias a que existe un gradiente eléctrico y químico del mismo entre el exterior y el interior celular. La posibilidad de mantener niveles intracelulares de Ca^{2+} en el rango nanomolar se debe al hecho de que en condiciones de reposo, la membrana celular es impermeable al catión, y a que las células excitables disponen de mecanismos muy eficientes que permiten una entrada muy rápida del Ca^{2+} , que conduce a una elevación transitoria de la concentración citosólica del mismo, la cual accionará una respuesta fisiológica concreta, como puede ser un proceso contráctil o secretor. En ninguno de los casos esta elevación de la concentración citosólica de Ca^{2+} se mantendrá sostenida en el tiempo por largos periodos ya que la célula posee mecanismos intracelulares que secuestran calcio con gran avidez, así como de transportadores de membrana plasmática que lo expulsan hacia el exterior celular (Artalejo y col., 1987).

2.2.2 Homeostasia del ion Ca^{2+} en célula cromafín

La concentración del ión Ca^{2+} intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en una célula excitable y en condiciones basales de reposo se encuentra entre 0.05-0.15 μM (Cavero y Spedding, 1983; García-Sancho y Verkhratsky, 2008). De forma similar, en reposo la concentración de Ca^{2+} mitocondrial $[\text{Ca}^{2+}]_M$ está en el mismo rango que la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, mientras que la concentración de Ca^{2+} del retículo endoplásmico $[\text{Ca}^{2+}]_{RE}$ es mucho mayor ($0.5-1 \times 10^3 \mu\text{M}$) (García-Sancho y Verkhratsky, 2008); la concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular (Figura 2.1; $[\text{Ca}^{2+}]_e$) es de entorno a $1-2.5 \times 10^3 \mu\text{M}$; por lo tanto existe un inmenso gradiente eléctrico y químico que favorece la difusión del Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico —Figura 2.1; ER (3)— y el medio extracelular hacia el

citosol (Figura 2.1; $[Ca^{2+}]_c$). Es esta la razón por la cual el Ca^{2+} sirve como un excelente mensajero, capaz de traducir con precisión cualquier estímulo externo en una señal intracelular de calcio determinada, señal que va a accionar una respuesta fisiológica como puede ser la contracción del músculo esquelético o la secreción de catecolaminas en la célula cromafín. La mayor parte de este Ca^{2+} se encuentra ligado a una gran variedad de proteínas o tampones endógenos de Ca^{2+} —Figura 2.1; CCB (2)— o retenido en mitocondrias —Figura 2.1; MIT (4)—, núcleo —Figura 2.1; NUCLEUS (8)—, vesículas sinápticas —Figura 2.1; CV (9)—, retículo endoplásmico liso —Figura 2.1; ER (3)— o retículo sarcoplásmico (García y col., 2012). Una serie de bombas —Figura 2.1; PMCA (6)— e intercambiadores de Ca^{2+} de la membrana plasmática —Figura 2.1; NCX (7)— se encargan de mantener la $[Ca^{2+}]_c$ basal alrededor de $0.1 \mu M$; se necesitan entorno a estas concentraciones de Ca^{2+} para accionar la gran mayoría de respuestas fisiológicas de la célula.

La apertura de los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática —Figura 2.1; (1)— o la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (a través de los canales de calcio activados por calcio o por IP3) —Figura 2.1; ER (3)— durante la activación celular desencadena la difusión de Ca^{2+} hacia el citosol, incrementando la $[Ca^{2+}]_c$. Los CCDV —Figura 2.1; (1)— se abren durante el potencial de acción permitiendo una corriente de entrada de Ca^{2+} ; si la frecuencia de potenciales de acción es baja, la tasa de difusión de Ca^{2+} hacia el citosol y su unión a los tampones endógenos de Ca^{2+} —Figura 2.1; CCB (2)— son los principales determinantes de la señal de calcio citosólica $[Ca^{2+}]_c$ (Neher, 1998). Bajo estas condiciones, la $[Ca^{2+}]_c$ puede alcanzar o superar el valor de $1 \mu M$; el aclaramiento del Ca^{2+} citosólico se lleva a cabo a través de las bombas de Ca^{2+} de alta afinidad de la membrana plasmática —Figura 2.1; PMCA (6)— y de la membrana del retículo endoplásmico (SERCA).

Cuando la célula está sujeta a una fuerte despolarización, por ejemplo bajo despolarizaciones sostenidas o bajo una alta frecuencia de disparo de potenciales de acción la $[Ca^{2+}]_c$ puede alcanzar los valores de $10 \mu M$. Esta concentración citosólica de Ca^{2+} es lo suficientemente grande como para abrir el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU, de inglés *mitochondrial Ca^{2+} uniporter*) y que la mayor parte del Ca^{2+} que entra al citosol sea acumulado en el interior de la mitocondria (Herrington y col., 1996;

Villalobos y col., 2002). Se ha estudiado que durante despolarizaciones sostenidas de 10 s con una solución de alto potasio (como la que ha sido utilizada en parte de este trabajo de tesis), el 90% del Ca^{2+} que entra a la célula durante la estimulación es recaptado por la mitocondria. Más tarde, cuando la estimulación cesa, el calcio acumulado en la mitocondria es liberado al citosol durante un periodo de segundos o minutos (Villalobos y col., 2002). La $[\text{Ca}^{2+}]_c$ permanece ligeramente elevada en esta fase; esto puede movilizar vesículas secretoras desde el contingente de reserva hacia el contingente de vesículas inmediatamente liberables, donde van a estar preparadas para sufrir exocitosis en el siguiente estímulo (Neher, 1998). El Ca^{2+} acumulado en la mitocondria estimula la respiración (Gunter y col., 1994; Villalobos y col., 2002); esto puede suponer un aporte energético extra para la célula el cual puede ser usado para aclarar la sobrecarga de Ca^{2+} y restablecer la homeostasis celular.

En síntesis, la transmisión sináptica y la secreción neuroendocrina están mediadas fundamentalmente por la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los CCDV localizados en la membrana plasmática (Augustine y Neher, 1992). Sin embargo las células cromafines poseen otros mecanismos capaces de incrementar el Ca^{2+} citosólico, a saber: La liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático (RE) a través de receptores de rianodina y/o de IP_3 o por medio del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática trabajando en su forma reversa (Pan y Kao, 1997).

Las células cromafines poseen también varios mecanismos de retirada o aclaramiento del Ca^{2+} citosólico en caso de que este aumente: la Ca^{2+} - ATP_{asa} (6, PMCA) y el intercambiador $1\text{Ca}^{2+}/3\text{Na}^+$ de la membrana plasmática (7, NCX) (Pan y Kao, 1997), una Ca^{2+} - ATP_{asa} en el RE (SERCA) y en la membrana interna mitocondrial (MCU) (Herrington y col., 1996). Todos estos sistemas pueden potencialmente influir en la distribución espacio-temporal de la señal de Ca^{2+} de las células cromafines (Marengo y Monck, 2003).

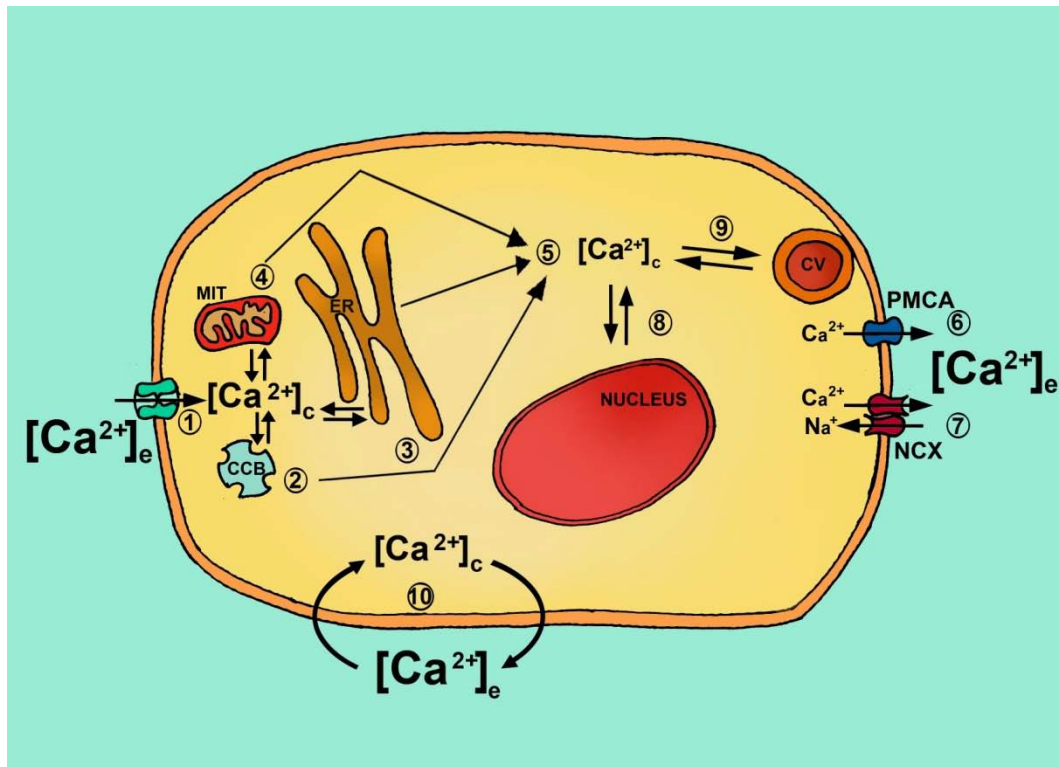


Figura 2.1 – Ciclo del Ca^{2+} en la célula cromafín. Después de la despolarización celular, el Ca^{2+} extracelular entra a la célula a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (1, CCDV). Esto genera un transiente local de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), con fases de activación y aclaramiento que exhibe un patrón espacio-temporal fuertemente regulado por los cercanos y pobremente estudiados tampones de calcio citosólico (2, CCB), el retículo endoplásmico (3, ER) y la mitocondria (4, MIT). El Ca^{2+} captado por las organelas y los tampones de Ca^{2+} citosólico es liberado de nuevo alrededor de todo el citosol permitiendo su redistribución hacia el núcleo de la célula (5). Finalmente, para restablecer el balance de Ca^{2+} celular, la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (6, PMCA) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática (7, NCX) expulsan hacia el espacio extracelular el exceso de Ca^{2+} . El núcleo (8) y las vesículas cromafines (9, CV) pueden también contribuir a la redistribución del calcio. Imagen tomada de García y col., (2012).

2.2.3 Fuentes extracelulares de calcio

2.2.3.1 Canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV)

La principal vía de entrada del Ca^{2+} a las células nerviosas, musculares y algunas células endocrinas son los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV). Fueron descubiertos en 1953 tras la observación inesperada de que los potenciales de acción del músculo de cangrejo persistían en ausencia de Na^+ externo. Los CCDV son glicoproteínas oligoméricas embebidas en la bicapa lipídica de la membrana celular que permiten selectivamente el paso de iones Ca^{2+} a través de la membrana plasmática en

respuesta a una despolarización y en virtud de la existencia de un gradiente electroquímico para este ión. La caracterización molecular de los CCDV comenzó con la purificación y clonación de los canales de Ca^{2+} del músculo esquelético, denominado en su tiempo receptor de dihidropiridinas. Se pudo observar que este complejo canal estaba constituido por cinco subunidades proteicas, denominadas: $\alpha 1$ (175 kDa), $\alpha 2$ (143 kDa), δ (24-27 kDa), γ (30 kDa) y β (54kDa) (Figura 2.2A). Las subunidades $\alpha 2$ y δ se encuentran unidas tras acontecer la traducción proteica por puentes disulfuro (Figura 2.2A y C) formando una subunidad única referida como $\alpha 2\delta$ (Takahashi y col., 1987).

La subunidad $\alpha 1$ es el principal componente de los CCDV y es la responsable de sus propiedades farmacológicas y biofísicas; es la subunidad que forma el poro del canal a través del cual ingresa el ion Ca^{2+} (Figura 2.2A), y es la que distingue a los diferentes subtipos de CCDV (Catterall, 2000); las otras subunidades adquieren una función reguladora y un papel auxiliar. En particular, la subunidad β juega un papel crucial en el tráfico de los canales hacia la membrana plasmática, en la puesta a punto de la apertura de la compuerta iónica y en la regulación del canal por otras proteínas y señales moleculares.

La subunidad $\alpha 1$ es una proteína de entre 190 a 250 kDa que tiene un tamaño aproximado de 2000 aminoácidos y mantiene la misma estructura general que los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Tsien y col., 1991); es decir que está constituida por 4 dominios homólogos (Figura 2.2B), los que a su vez están formados cada uno de ellos por 6 segmentos transmembrana. El cuarto de estos segmentos, denominado S_4 , está altamente constituido por aminoácidos con carga positiva y por lo tanto actúa como el sensor de voltaje (Hille, 2001), mientras que los segmentos S_5 y S_6 , incluido el bucle entre ellos, contribuyen a la formación del poro del canal (Figura 2.2B); estos cuatro bucles reentrantes de membrana entre los segmentos S_5 y S_6 (denominados bucles P) conforman el filtro de selectividad iónica (Figura 2.2B, en verde) donde se encuentran 4 aminoácidos altamente conservados cargados negativamente (glutamato y aspartato).

Los CCDV, como ocurre también para los canales dependientes de voltaje de Na^+ y de K^+ , son altamente selectivos para un tipo iónico determinado. Cuando está

abierto, el canal forma un poro que se extiende a través de toda la anchura de la membrana. Este poro es en casi toda su longitud mucho más ancho que el ión, salvo en un pequeño segmento donde se encuentra el filtro que establece la selectividad iónica del canal. Este filtro restringe el paso del ión de acuerdo con el tamaño, carga y energía libre de hidratación del ión (Catterall, 2011). La apertura del canal requiere un cambio de conformación de la proteína, lo que acontece cuando se aplica un cambio de voltaje sobre la misma.

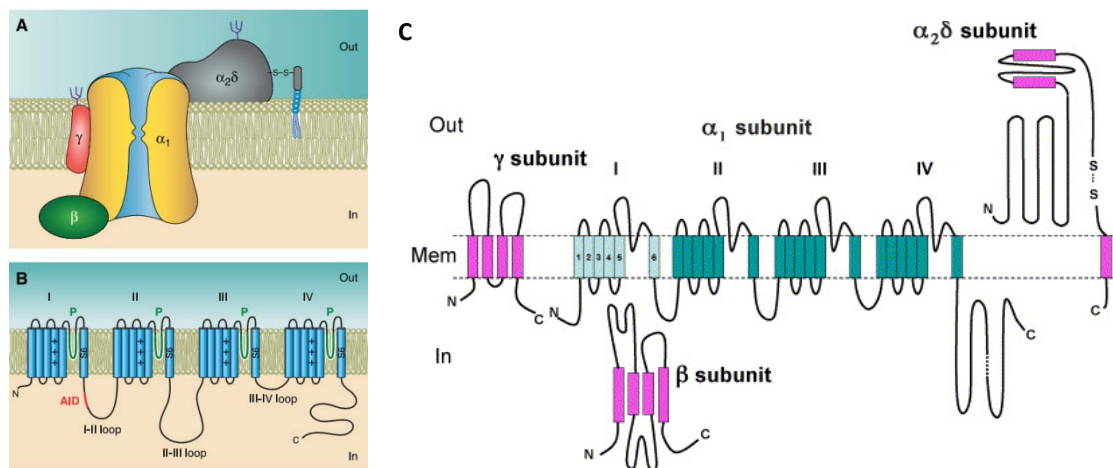


Figura 2.2- (A) Organización molecular de un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje. La estructura molecular del canal consta de cinco subunidades: α_1 , α_2 , δ , γ y β . La subunidad α_1 es la que distingue a los diferentes subtipos de canales y la que forma el poro. (B) Estructura detallada de la subunidad α_1 . La subunidad α_1 a su vez está formada por cuatro dominios con 6 segmentos transmembrana cada uno de ellos. Se representa el segmento S4 con cargas positivas (+++) como el sensor de voltaje; en verde y entre los segmentos transmembrana 5 y 6 aparecen representados los cuatro bucles reentrantes P que conforman el filtro de selectividad iónica. En el bucle citoplasmático que conecta las dos primeras repeticiones homólogas de la subunidad α_1 , (I-II loop), aparece en color rojo representado el sitio de unión de alta afinidad de la subunidad α_1 con la subunidad β (AID). (C) Estructura detallada de la subunidad α_1 y del resto de subunidades reguladoras. Esquemas modificados de Buraei y Yang (2010).

La dependencia del voltaje para los CCDV ya fue descrita inicialmente en el modelo de Hodgkin y Huxley (1952). Cuando la corriente de Ca^{2+} (I_{Ca}) es activada por un cambio de voltaje en la membrana plasmática, el desarrollo de esta corriente posee un curso temporal de tipo sigmoideo; existe un cierto retraso en la apertura de los canales. Esto indica que hay más de un estado en el que el canal se encuentra cerrado o abierto. Los registros de I_{Ca} a través de canal único han permitido estudiar que, una vez que el canal alcanza el estado abierto a través de un proceso relativamente lento, se producen series rápidas de aperturas y cierres (apertura del canal en ráfagas).

Inicialmente algunos autores, estudiando la distribución de frecuencias de tiempos de apertura y cierre del canal, propusieron un modelo con dos estados del canal, un estado cerrado y otro estado abierto (Figura 2.3) (Fenwick y col., 1982); actualmente se sabe que los CCDV poseen dos compuertas, una de activación y otra de inactivación, que permiten modificar su posición (abierto/cerrado) al modificarse el potencial de membrana gracias a los sensores de voltaje. Ello permite que el canal se presente en tres formas posibles: reposo (cerrado), activado (abierto) e inactivado (Figura 2.3); de forma que, una vez inactivado, el canal debe volver a la posición de reposo, antes de volver a activarse, y a este proceso se le denomina reactivación del canal de calcio (Figura 2.3).

En los CCDV podemos encontrar cuatro fases o procesos: activación, desactivación, inactivación y reactivación. En el modelo de canal iónico con dos compuertas que presentamos (compuerta de activación y compuerta de inactivación) — Figura 2.3— ambas deben de estar abiertas para que los iones Ca^{2+} puedan ser conducidos al interior celular. La activación del CCDV es el proceso de apertura de la compuerta de activación que ocurre tras la despolarización del interior celular (Figura 2.3). La desactivación es el proceso opuesto, el cierre de la compuerta de activación cuando el interior de la membrana celular se vuelve más negativo (repolarización). La inactivación ocurre con el cierre de la compuerta de inactivación (Figura 2.3), en este estado el voltaje del interior celular continúa siendo positivo, acontece tras un retardo de tiempo en el que el canal esta activo y abierto; el cierre de la compuerta de inactivación hace que el canal pierda la capacidad de conducir iones Ca^{2+} a su través. Cuando el potencial de membrana vuelve al estado de reposo el CCDV sufre la recuperación de la inactivación (reactivación) y se encuentra listo para volver a ser activado. Tanto el proceso de inactivación como el de desactivación hacen que el CCDV pierde la capacidad de conducir iones Ca^{2+} , sin embargo mientras que la inactivación acontece cuando el V_m permanece positivo la desactivación se facilita cuando el V_m se vuelve negativo.

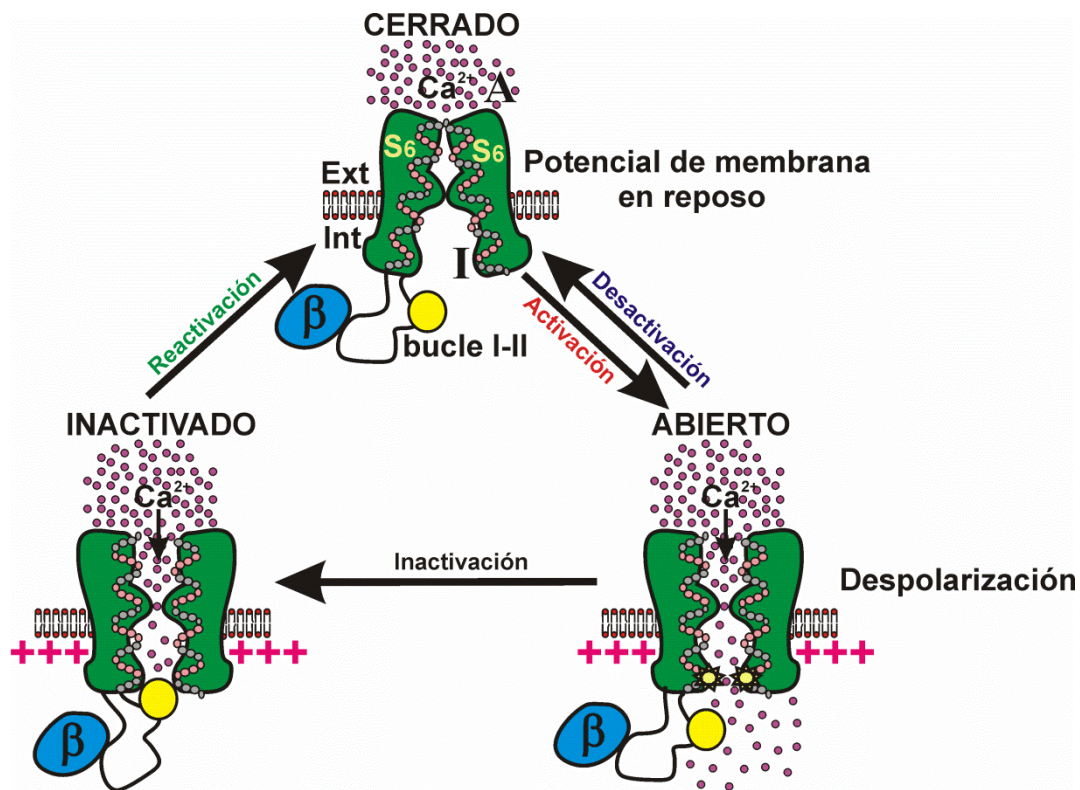


Figura 2.3- Posible modelo para la inactivación de los CCDV. El CCDV puede encontrarse en tres estados posibles: **Cerrado** y disponible para ser activado (en reposo), **abierto** (activo) tras acontecer una despolarización de la membrana plasmática, pudiendo permear los iones de calcio a su través; y cerrado, pero sin poder ser activado (**inactivado**). En respuesta a la despolarización de la membrana los segmentos S6 se someten a un cambio conformacional que desenmascaran uno sitios de acoplamiento (representados como estrellas amarillas de 9 puntas) para la compuerta de inactivación formada por los dominios de los bucles citoplasmáticos I y II. Sobre las flechas se identifican las 4 fases o procesos en los que se puede encontrar el CCDV: Activación, desactivación, inactivación y reactivación; **A**, representa la compuerta de activación e **I** la compuerta de inactivación. Elaboración propia, inspirado en los trabajos de Stotz y Zamponi (2001).

En el estado activado, el CCDV fluctúa entre abierto y cerrado y no hay evidencias experimentales que sugieran niveles de conductancia intermedios como los encontrados en otros canales iónicos. La probabilidad (P) de que un canal único pueda abrirse aumenta con la despolarización, desde cero hasta un nivel de saturación que se asume como la unidad; con fuertes despolarizaciones “ P ” se aproxima a la unidad. La naturaleza del catión que permea a través de los CCDV (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) modifica las características cinéticas de estas transiciones (Fenwick y col., 1982; Saimi y Kung., 1982). Hubo otros autores que propusieron modelos con más de tres estados para explicar ciertos comportamientos cinéticos (Hagiwara y Byrley, 1983; Hoshi y col., 1984).

Desde un punto de vista fisiológico, la inactivación es un proceso común y crítico en muchos tipos de canales iónicos dependientes de voltaje. Por ejemplo, en el canal de sodio dependiente de voltaje la inactivación tan rápida que sufre determina la duración del potencial de acción y el periodo refractario en tejidos excitables. En la actualidad no se sabe mucho sobre el proceso de inactivación de los CCDV (Stotz y Zamponi, 2001); sin embargo el proceso de inactivación de los canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje, cuyas estructuras moleculares se asemejan a la de los CCDV, se encuentra mejor descrito. Los CCDV presentan varios mecanismos de inactivación para controlar la entrada de Ca^{2+} al interior celular: inactivación rápida dependiente de voltaje (Stotz y Zamponi, 2001; Zhang y col., 1994), inactivación dependiente de Ca^{2+} (Hagiwara y Nakajima, 1966; Brehm y Eckert, 1978; Tillotson, 1979; Hagiwara y Byerly, 1981; Eckert y Chad, 1984) e inactivación lenta dependiente de voltaje (Sokolov y col., 2000). En sistemas de expresión heteróloga, las subunidades $\alpha 1$ de los canales de Ca^{2+} no requieren de subunidades auxiliares para presentar una inactivación dependiente de voltaje, lo que sugiere que la inactivación es un proceso intrínseco de la subunidad $\alpha 1$ (Nargeot, 1992).

En las células musculares esqueléticas y cardíacas, la activación de los CCDV inicia la contracción muscular directamente al incrementar la concentración de Ca^{2+} citosólico (Figura 2.3.2) e indirecta y mayoritariamente por la actuación de la liberación de calcio inducida por calcio que entra a la célula a través de los CCDV (mecanismo CICR, del inglés Calcium-Induced Ca^{2+} Release), y mediada gracias a canales liberadores de Ca^{2+} (receptores de rianodina) del retículo sarcoplásmico (Reuter, 1979; Bers 2000). En las células musculares esqueléticas, los CCDV presentes en las membranas tubulares transversales interaccionan directamente con los canales liberadores de Ca^{2+} sensibles a rianodina (receptores de rianodina) presentes en el retículo sarcoplásmico, activándolos para iniciar una rápida contracción (Catterall, 1991; Tanabe y col., 1993).

En células endocrinas y neuroendocrinas (célula cromafin) los CCDV median la entrada de Ca^{2+} que inician la secreción de hormonas (Figura 2.3.2) (Yang y Berggren, 2006). En neuronas los CCDV inician la transmisión sináptica (Tsien y col., 1988;

Dunlap y col., 1995; Catterall y Few, 2008). En muchos tipos celulares diferentes, la entrada de Ca^{2+} al citosol vía CCDV regula la actividad enzimática, la expresión de genes y otros procesos bioquímicos (Figura 2.3.2) (Flavell y Greenberg, 2008). Por tanto, los CCDV adquieren un papel clave en la transducción de la excitabilidad eléctrica, convirtiendo las señales eléctricas de los potenciales de acción de la membrana plasmática en un transiente de Ca^{2+} intracelular. La transducción de la señal de Ca^{2+} en diferentes tipos celulares involucra a diferentes subtipos moleculares de CCDV los cuales median corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje con propiedades fisiológicas, farmacológicas y reguladoras distintas.

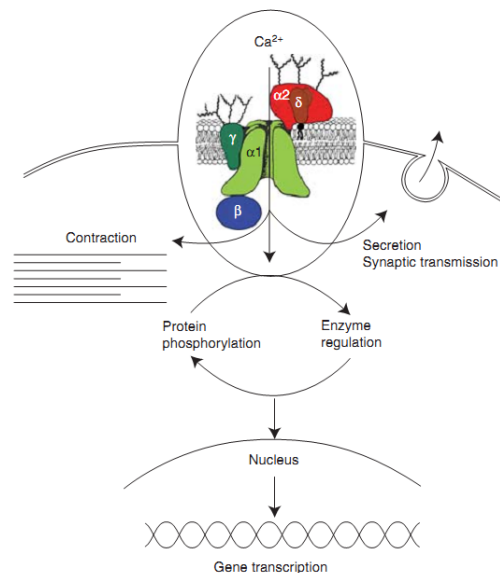


Figura 2.3.2 - Señal de transducción operada por los CCDV. El Ca^{2+} que entra en la célula inicia numerosos eventos intracelulares, tales como la contracción, secreción, transmisión sináptica, regulación enzimática, fosforilación/desfosforilación de proteínas y transcripción génica (Esquema tomado de Catterall, 2011).

Las células cromafines sometidas a despolarizaciones sucesivas en forma creciente desde el valor de reposo de membrana (aproximadamente -65 mV en CCER) hasta potenciales más positivos, muestran primero un aumento en la corriente de Ca^{2+} (I_{Ca}) desde el umbral de activación (aproximadamente en -60 mV en CCER) hasta llegar a un máximo de corriente (pico de la I_{Ca}) que se sitúa aproximadamente entre -10 mV y 0 mV en CCER; en este punto la mayoría de los CCDV están abiertos. Si se aumenta aún más el potencial, la corriente disminuye, porque a pesar de que la probabilidad de apertura de los canales aumenta, la fuerza impulsora de los iones de Ca^{2+} se hace cada

vez más pequeña cuando V_m se va acercando al valor de potencial de reposo o potencial de reversión para el calcio (E_{Ca}) aproximadamente de +60 mV en CCER usando 2mM de Ca^{2+} extracelular (Hille, 2001).

A continuación se muestra en la Figura 2.3.3 una curva que representa la corriente de calcio en función del voltaje aplicado en la despolarización (curva I-V); fue obtenida experimentalmente en nuestro laboratorio utilizando como modelo experimental la célula cromafín embrionaria de rata (CCER). La relación corriente de Ca^{2+} frente a voltaje muestra una respuesta bifásica con un hombro de corriente (Figura 2.3.3, en amarillo) en el rango de voltajes negativos (entre -50 y -20 mV). Este hombro en la respuesta bifásica es indicativo de la existencia de CCDV de bajo umbral de activación (LVA, del inglés *low-voltage-activated calcium channels*) ó canales “tipo T”; la presencia de estos canales es característico de las células cromafines embrionarias (Carabelli y col., 2007; Levitsky y López-Barneo, 2009).

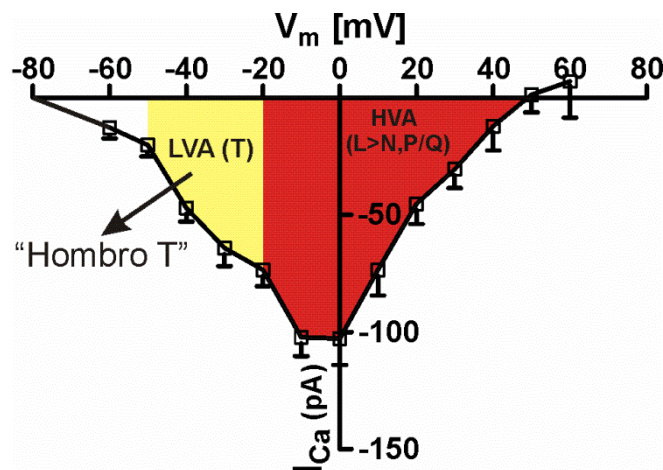


Figura 2.3.3 – Ejemplo de una curva I-V obtenida en CCER. En la gráfica se representa la intensidad de la corriente de calcio frente a los diferentes voltajes aplicados en los sucesivos pulsos despolarizantes cuadrados desde un potencial de fijación de -80 mV. La relación corriente de Ca^{2+} frente a voltaje muestra una respuesta bifásica con un umbral de activación en torno a -60 mV, un máximo de amplitud de corriente en torno a 0 mV y un hombro de corriente en el rango de voltajes negativos (-50/-20). Este hombro en la respuesta bifásica de activación es indicativo de la existencia de CCDV de bajo umbral de activación (LVA, del inglés *low-voltage-activated calcium channels*) ó canales “tipo T”; en el resto de la respuesta bifásica se activan mayoritariamente los CCDV de alto umbral de activación (HVA, del inglés *high-voltage-activated calcium channels*).

La siguiente fase de la curva I-V se caracteriza por localizarse en valores del V_m más despolarizantes y presentar el pico máximo de amplitud de corriente (Figura 2.3.3, en rojo), esta corriente es debida a la activación de una gran población de CCDV de alto umbral de activación (HVA, del inglés *high-voltage-activated calcium channels*), donde el subtipo L adquiere protagonismo tanto cualitativamente como cuantitativamente (como veremos posteriormente en el desarrollo de los resultados de esta tesis). Debido a que se pone de manifiesto la existencia de varios subtipos de CCDV en la CCER, procedemos a continuación a describir las principales propiedades funcionales y farmacológicas de los distintos subtipos de CCDV.

2.2.3.2 Propiedades funcionales y farmacológicas de los distintos subtipos de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV)

Los CCDV se subdividen en varios subtipos presentes en distintas células excitables (Tabla 2.1), identificados mediante técnicas electrofisiológicas de patch-clamp. Con el uso de esta técnica se ha llegado a identificar hasta 6 subtipos de CCDV que se denominan con las letras L, N, P, Q, T y R. La distinción entre estos canales se lleva a cabo sobre las bases de sus propiedades cinéticas de apertura y cierre, pero sobre todo gracias a su sensibilidad a fármacos y toxinas con selectividad para uno u otro subtipo de canal. Investigaciones posteriores mostraron que los subtipos de CCDV de alto umbral de activación (HVA) L, N, P/Q y R están compuestos de las subunidades α_1 , $\alpha_2\delta$, β y en algunos tejidos también por la subunidad γ (Figura 2.2A); por otra parte los CCDV de bajo umbral de activación (LVA) o canales tipo T parece ser que requieren solamente la subunidad α_1 (Pérez-Reyes, 2003, 2006).

La mayoría de los sitios de unión para los distintos fármacos y toxinas están localizados en la subunidad α_1 de los CCDV (Catterall, 2000); por lo tanto la subunidad α_1 posee todas las principales características que definen a los CCDV, incluyendo las propiedades farmacológicas y biofísicas como la apertura, selectividad iónica y permeabilidad. La subunidad α_1 de mamíferos esta codificada por 10 genes distintos ; basándose en similitud de secuencias de aminoácidos la subunidad α_1 de los CCDV se divide en tres subfamilias: Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 (Tabla 2.1) (Ertel y col., 2000; García y col., 2006). La subfamilia Ca_v1 incluye los canales que conducen la corriente de Ca^{2+} de

tipo L, la subfamilia Ca_v2 incluye los canales que conducen la corriente de Ca^{2+} de tipo N, P/Q y R; y la subfamilia Ca_v3 incluye los canales que conducen la corriente de Ca^{2+} de tipo T.

Desde los primeros registros de corrientes de Ca^{2+} en miocitos cardíacos comenzó a ponerse de manifiesto que hay múltiples tipos de corrientes de Ca^{2+} definidas por criterios fisiológicos y farmacológicos (Tsien y col., 1988; Llinás y col., 1992; García y col., 2006). En el corazón, músculo liso y músculo esquelético las corrientes de Ca^{2+} principales se distinguen por el alto voltaje de activación, una gran conductancia en experimentos de canal único, una lenta inactivación dependiente de voltaje, una marcada sobreexpresión de proteínas dependientes de AMPc y la inhibición específica por fármacos calcio-antagonistas entre los que se incluyen las dihidropiridinas, fenilalquilaminas y benzodiacepinas (Reuter, 1979; Tsien y col., 1988).

Estas corrientes de Ca^{2+} fueron designadas como corrientes de tipo L (Tabla 2.1), ya que tienen una lenta inactivación dependiente de voltaje y por tanto la corriente se ve prolongada en el tiempo cuando el Ba^{2+} es el portador de la carga, no sufriendo inactivación dependiente de Ca^{2+} (Tsien y col., 1988). Las corrientes de Ca^{2+} de tipo L se han registrado también en células endocrinas donde son las responsables de iniciar la liberación de hormonas (Yang and Berggren, 2006) y en neuronas donde son importantes en la regulación de la expresión de genes y en accionar la liberación del neurotransmisor (Tsien y col., 1988). Las corrientes de Ca^{2+} de tipo L están sometidas a una regulación mediante la fosforilación de proteínas activadas por segundos mensajeros.

Estudios electrofisiológicos de corrientes de Ca^{2+} en huevos de estrella de mar (Hagiwara y col., 1975) revelaron por vez primera unas corrientes de Ca^{2+} con propiedades diferentes de las de tipo L, las cuales fueron posteriormente mejor caracterizadas en neuronas ganglionares de raíz dorsal (Carbone y Lux, 1984; Nowycky y col., 1985). En comparación con las corrientes de tipo L, estas nuevas corrientes se activaban a potenciales de membrana mucho más negativos, se inactivaban rápidamente, tenían una pequeña conductancia de canal único y resultaron ser

insensibles a los fármacos calcio-antagonistas disponibles en aquella época. Fueron designadas como corrientes de Ca^{2+} de bajo umbral de activación por su dependencia de voltajes más negativos (Carbone y Lux, 1984) o corrientes de Ca^{2+} tipo T, con la T del inglés “*transient currents*”, debido a que generan un componente transitorio de corriente de Ca^{2+} de entrada (Tabla 2.1).

Los registros de canal único de neuronas ganglionares de raíz dorsal revelaron una nueva corriente de Ca^{2+} , la corriente tipo N (Nowycky y col., 1985). La corriente de tipo N fue inicialmente distinguida por su dependencia de voltajes intermedios para su activación (ni de alto umbral, ni de bajo umbral) y por su tasa de inactivación; más rápida que la de los CCDV de tipo L pero más lenta que la de los CCDV de tipo T. Los canales N son insensibles a los bloqueantes orgánicos de CCDV de tipo L, pero se bloquean por la neurotoxina peptídica ω -conotoxina GVIA (Tabla 2.1) aislada del veneno del caracol marino del género *Conus* y por otros péptidos afines (Tsien y col., 1988; Olivera y col., 1994).

El análisis farmacológico de los efectos de otras neurotoxinas peptídicas revelan tres tipos más de corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje: las corrientes de Ca^{2+} de tipo P, se registraron por vez primera en neuronas de Purkinje (Llinás y Yarom, 1981) y se distinguen por su gran sensibilidad a la neurotoxina peptídica de la araña americana *Agelenopsis aperta* ω -agatoxina IVA (Tabla 2.1) (Mintz y col., 1992). Otro de los tipos de corrientes de Ca^{2+} son las de tipo Q, registradas inicialmente en neuronas granulares de cerebelo (Randall y Tsien, 1995); son bloqueadas de igual forma por la ω -agatoxina IVA aunque con menor afinidad. Por último, encontramos las corrientes de Ca^{2+} de tipo R, que son resistentes a la mayoría de bloqueantes de canales de Ca^{2+} peptídicos y orgánicos; pueden ser bloqueadas selectivamente en algunos tipos celulares por el derivado peptídico SNX-482 procedente de la tarántula africana *Hysterocrates gigas* (Tabla 2.1) (Newcomb y col., 1998).

Tabla 2.1- Nomenclatura, distribución, farmacología y funcionalidad de los distintos subtipos de canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje. Los canales tipo T son activados por voltaje bajos (LVA), mientras que el resto de los que se clasifican en la tabla son activados por voltajes altos (HVA). Esta figura fue elaborada basándonos en los trabajos de Catterall, 2011; García y col., 2006. Abreviaturas: SNP, Sistema Nervioso Periférico; PA, potenciales de acción.

Nomenclatura nueva	Nomenclatura tradicional	Subunidad $\alpha 1$ que contribuye	Activación	Tipo de corriente	Inhibidor específico	Activador	Tejido	Funciones fisiológicas principales
$\text{Ca}_v 1.1$	α_{1S}	$\alpha 1.1$		L	Dihidropiridinas	BayK 8644 / FPL64176	Músculo esquelético	Acoplamiento excitación-contracción músculo esquelético / Regulación transcripción
$\text{Ca}_v 1.2$	α_{1C}	$\alpha 1.2$		L	Dihidropiridinas	BayK 8644 / FPL64176	Músculo liso / Corazón / Cerebro / Médula adrenal	Acoplamiento excitación-contracción músculo liso y cardíaco / secreción endocrina / Regulación actividad enzimática
$\text{Ca}_v 1.3$	α_{1D}	$\alpha 1.3$		L	Dihidropiridinas	BayK 8644 / FPL64176	Cerebro / Páncreas / Riñón / Médula adrenal	Secreción endocrina / Marcapasos cardíaco / Transientes de Ca^{2+} neuronales en cuerpos celulares y dendritas
$\text{Ca}_v 1.4$	α_{1F}	$\alpha 1.4$		L	Dihidropiridinas	BayK 8644 / FPL64176	Retina	Transducción visual
$\text{Ca}_v 2.1$	α_{1A}	$\alpha 2.1$		P/Q	ω -agatoxina IVA ω -conotoxina MVIIC ω -conotoxina MVIID		Cerebelo / Pituitaria / Médula adrenal	Liberación de neurotransmisores / Transientes de Ca^{2+} dendríticos
$\text{Ca}_v 2.2$	α_{1B}	$\alpha 2.2$		N	ω -conotoxina GVIA ω -conotoxina MVIIA		Cerebro / SNP / Médula adrenal	Liberación de neurotransmisores / Transientes de Ca^{2+} dendríticos
$\text{Ca}_v 2.3$	α_{1E}	$\alpha 2.3$		R	SNX-482		Cerebro / Retina / Corazón / Médula adrenal	Liberación de neurotransmisores / Transientes de Ca^{2+} dendríticos
$\text{Ca}_v 3.1$	α_{1G}	$\alpha 3.1$		T	Ninguno		Cerebro / SNP / Corazón / Médula adrenal	Marcapasos / Disparo repetitivo de PA
$\text{Ca}_v 3.2$	α_{1H}	$\alpha 3.2$		T	Ninguno		Cerebro / Riñón / Hígado / Médula adrenal	Marcapasos / Disparo repetitivo de PA
$\text{Ca}_v 3.3$	α_{1I}	$\alpha 3.3$		T	Ninguno		Cerebro	

Aunque las corriente de Ca^{2+} de tipo T y de tipo L se expresan en un amplio rango de tipos celulares, las corrientes de Ca^{2+} de tipo N, P, Q y R están más presentes en neuronas (Tabla 2.1). Todos estos tipos de corriente de Ca^{2+} se encuentran en células cromafines de mamíferos variando su proporción entre las distintas especies (García y col., 2006); las corrientes de Ca^{2+} de tipo T se encuentran principalmente expresadas en células cromafines embrionarias (Bournaud y col., 2001) y en células cromafines de neonatos (Levitsky y Lopez-Barneo, 2009); el desarrollo del animal se correlaciona con una menor expresión de la subunidad proteica que conforma el canal de Ca^{2+} de tipo T y la proporción de células cromafines adultas que poseen esta corriente se reduce drásticamente (Hollins e Ikeda, 1996; Novara y col., 2004).

2.2.3.3 CCDV tipo T: características electrofisiológicas y farmacológicas de los CCDV de tipo T frente a los no tipo T

Aunque los CCDV de tipo T fueron descubiertos hace muchos años, aún hay mucha controversia sobre sus características electrofisiológicas y farmacológicas y todavía se discute su clasificación como un nuevo tipo de CCDV (Ertel y Ertel, 1997). Fueron llamados de tipo T debido a que el curso temporal de su corriente era un transiente (T de transiente) ya que estos canales T se inactivaban mucho más rápido que los CCDV de tipo L ($\tau_{\text{inactivación}}$ aproximadamente de 5-50 ms para los T frente a 500 ms para los L) (Bean, 1989; Nowycky y col., 1985) (Ver tabla 2.2). Por lo tanto la $\tau_{\text{inactivación}}$ es ahora el identificador más usado y fiable para corroborar la presencia de los CCDV de tipo T en lugar de los fármacos selectivos descritos hasta el momento (Ni^{2+} , mibefradilo y NNC entre otros) (Fernández-Morales y col., 2013). Otros identificadores usados son la activación e inactivación dependientes de voltaje con distintos rangos de voltaje (más negativos o bajos para los CCDV de tipo T comparado con los otros subtipos de CCDV) (Ver tabla 2.2). La activación de los CCDV de tipo T comienza entre -70 a -50 mV y alcanza el pico de corriente alrededor de -40 a -20 mV (Bonvallet, 1987; Carbone y Lux, 1984), mientras que la activación de los CCDV de tipo L se inicia en el rango de -30 a -10 mV y alcanza su máximo de corriente de +10 a +20 mV (Tsien y col., 1988; Bean, 1989).

Otra característica para diferenciar los subtipos de CCDV es la conductancia de canal único; así, la conductancia de los CCDV de tipo T es pequeña (alrededor de 5 pS) mientras que la del resto de CCDV es mayor de 10 pS (Nilius y col., 1985; Carbone y Lux, 1987) (Ver tabla 2.2). Los CCDV de tipo T tienen una permeabilidad semejante tanto para el ión Ca^{2+} como para el ión Ba^{2+} (Carbone y Lux, 1984) mientras que el resto de CCDV son más permeables al Ca^{2+} que al Ba^{2+} (Ganitkevich y Isenberg, 1990) (Ver tabla 2.2); un problema de esta propiedad es que el reemplazamiento del Ca^{2+} por el Ba^{2+} modifica la dependencia del voltaje por los CCDV, desplazando la relación corriente-voltaje (curva I-V) hacia la izquierda, pudiendo dar lugar a confusiones.

Los CCDV de tipo T se desactivan mucho más lento que el resto de CCDV de alto umbral de activación (Ver tabla 2.2); esto quiere decir que retornan de forma más lenta que el resto de canales del estado abierto al estado de reposo (cerrado) —Figura 2.3—. Los CCDV de tipo T tienen una constante temporal de desactivación de 1-10 ms mientras que el resto de CCDV de alto umbral su constante es mucho más rápida, de 0.5 ms (Carbone y Lux, 1987). La tasa de inactivación de los CCDV de tipo T es dependiente del voltaje, así, los CCDV de tipo T se inactivan mucho más rápido a voltajes más despolarizados (Beam and Knudson, 1988), mientras que la tasa de inactivación del resto de CCDV de alto umbral es independiente del voltaje (Ver tabla 2.2).

Disponemos de herramientas farmacológicas muy utilizadas y eficaces para distinguir los distintos subtipos de CCDV de alto umbral de activación; los bloqueantes selectivos dihidropiridínicos son antagonistas de los CCDV de tipo L, la ω -conotoxina GVIA para los CCDV de tipo N y la ω -agatoxina IVA para los CCDV de tipo P/Q (Ver tabla 2.2); sin embargo, como hemos indicado anteriormente, no existe todavía una herramienta farmacológica completamente satisfactoria para aislar los CCDV de tipo T, aunque muchas sustancias han sido usadas con resultados variables. El antagonista de los CCDV de tipo T más comúnmente usado ha sido el Ni^{2+} , que según esta descrito bloquea la mayoría de los CCDV de tipo T con una potencia 10 veces superior al resto de CCDV de alto umbral (Ver tabla 2.2), en un rango de concentraciones de entre 10 a 40 μM (Bonvallet, 1987; Gu y col., 1994). Sin embargo, algunos CCDV de tipo T parecen ser menos sensibles a Ni^{2+} (Akaike y col., 1989) mientras que otros subtipos de

CCDV de tipo no T son bastante sensibles e inhibidos por el catión, especialmente los CCDV de tipo R (Zhang y col., 1993). El Cd^{2+} fue inicialmente considerado un bloqueante más débil de los CCDV de tipo T que el Ni^{2+} (Ver tabla 2.2), sin embargo también se ha observado lo opuesto; así, se ha encontrado una IC_{50} más baja para el Cd^{2+} que para el Ni^{2+} , sobre el efecto de bloqueo de los CCDV de tipo T en neuronas piramidales de rata (Ye y Akaike, 1993).

En la actualidad carecemos de una adecuada farmacología sobre los CCDV de tipo T; si que podemos distinguir a estas corrientes por carecer de sensibilidad a las toxinas peptídicas y en cierto modo a los antagonistas dihidropiridínicos (a concentraciones menores de 3 μM) (Bean, 1985) (Ver tabla 2.2). Sin embargo otros muchos estudios realizados en neuronas de hipotálamo de rata (Akaike y col., 1989), neuronas de hipocampo de rata (Takahashi y col., 1989), células de músculo esquelético de aorta de rata (Kuga y col., 1990) y células de aurícula de cobaya (Cohen y col., 1992) indican que las dihidropiridinas, como por ejemplo felodipino o isradipino pueden actuar bloqueando los CCDV de tipo T.

Hay bastantes antagonistas de canales de Ca^{2+} no dihidropiridínicos que bloquean los CCDV de tipo T; entre ellos se incluiría el octanol (Bisagno y col., 2010), tetrametrina (Hagiwara y col., 1988), tetrandrina (Liu y col., 1992), difenilbutilpiperidinas (neurolépticos como penfluridol o fluspirileno) (Enyeart y col., 1992), amiodarona, bepridil, cinarizina (Cohen y col., 1992) y flunarizina (Tytgat y col., 1988). Ninguno de estos compuestos es realmente eficaz para bloquear de forma selectiva la corriente de Ca^{2+} de bajo umbral de activación o tipo T y han sido probados en diferentes modelos celulares y especies.

Se han descubierto algunos compuestos que bloquean de forma más selectiva los CCDV de tipo T: Amilorida (Tang y col., 1988), etosuximida (Coulter y col., 1989) y fenitoína (Yaari y col., 1987). El problema de estos compuestos es que para alcanzar un grado de bloqueo sustancial hacen falta elevadas concentraciones de los mismos que producen una inhibición de la corriente de Na^+ . Según se cita en la literatura, el mibefradilo requiere concentraciones relativamente bajas para bloquear los CCDV de tipo T de aproximadamente 1 μM ; esta selectividad del mibefradilo por los CCDV de

tipo T sobre los L es del orden de 10 a 30 veces y ha sido descrita en varios modelos celulares, lo que le ha dado la fama como uno de los compuestos más eficaces en la disección de la corriente T (Mishra y Hermsmeyer, 1994) (Ver tabla 2.2); sin embargo 1 μM de mibefradilo bloquea más de un 25% la corriente de alto umbral de activación en varios modelos de célula cromafín (ver Resultados, artículo 10).

Los CCDV de tipo T fueron descritos inicialmente en 1984 en neuronas sensoriales de rata y pollo (Carbone and Lux, 1984a, b) y desde entonces han sido halladas en una gran variedad de células excitables y no excitables (Bean, 1989; Hess, 1990). Se ha observado una importante corriente de Ca^{2+} de tipo T en células cardíacas de mamíferos como las células marcapasos del nodo sinoatrial de conejo (Hagiwara, 1988); también observamos corriente T en células de músculo liso vascular de arterias de muchas especies, en numerosas células secretoras como las células glomerulosas de la corteza adrenal secretoras de aldosterona de humano y bovino, en células fasciculadas de la corteza adrenal secretoras de cortisol de rata (Barbara y Takeda, 1995) y bovino (Mlinar y col., 1993), en células secretoras de calcitonina (células C) de la glándula tiroides de humano, en células de médula adrenal secretoras de catecolaminas embrionarias de rata (Bournaud y col., 2001; Carbone y col., 2006; Levitsky y Lopez-Barneo, 2009) y en células $\alpha 2$ pancreáticas secretoras de glucagón de cobaya (Rorsman, 1988).

Las células de la zona fasciculada de la corteza de glándula adrenal bovina expresan casi exclusivamente CCDV de tipo T, los cuales son por tanto la principal vía de entrada de Ca^{2+} . De hecho, el Ni^{2+} inhibe la secreción de cortisol estimulada por la hormona adrenocorticotropa (ACTH) o la angiotensina II, sugiriendo un importante papel de los CCDV de tipo T en el acoplamiento entre la despolarización de la membrana y la secreción (Enyeart y col., 1993). En las células de la zona glomerulosa de la corteza de glándula adrenal bovina los CCDV de tipo T están implicados en el proceso de secreción de aldosterona (Rossier y col., 1993). En estas células la génesis de esteroides puede ser activada por bajas concentraciones de potasio, las cuales inducen una débil despolarización de la membrana, suficiente para activar los CCDV de tipo T y sorprendentemente los CCDV de tipo L. De todos modos, la pequeña cantidad de Ca^{2+} que entra a través de los CCDV de tipo T, podría llegar a ser más efectiva en

estimular la secreción de aldosterona que la mayor cantidad de Ca^{2+} que entra a través de los CCDV de tipo L; esto podría deberse a una colocación más favorable con la maquinaria de la exocitosis de los CCDV de tipo T en la membrana plasmática (Rossier, 1997).

Como hemos comentado anteriormente, los CCDV de tipo T han sido hallados en neuronas sensoriales y centrales pero están menos extendidos en neuronas simpáticas de gran variedad de especies: humano, rata, ratón, cobaya y pollo. La presencia de los CCDV de tipo T en estas neuronas se ha relacionado con características fisiológicas y morfológicas específicas; por ejemplo en las neuronas del ganglio pélvico mayor los CCDV de tipo T han sido propuestos como marcadores del fenotipo adrenérgico, ya que solo las neuronas con este fenotipo expresan estos canales (Zhu y col., 1995).

Tanto en neuronas como en miocitos cardíacos los papeles electrofisiológicas de los CCDV de tipo T que se les atribuyen son los de marcapasos y control del disparo de ráfagas de PA. Los CCDV de tipo T predominan en el soma y dendritas de neuronas con fuerte dependencia de Ca^{2+} para desarrollar ráfagas de PA como las neuronas cerebelosas de Purkinje y las neuronas del tálamo. En neuronas piramidales de hipocampo de rata, los CCDV de tipo T están distribuidos a través de toda la célula pero están más concentrados en las dendritas. Las elevaciones del Ca^{2+} en las dendritas son necesarias para la generación de las ráfagas de PA somáticos, un proceso que se ha relacionado con la aparición de eventos epilépticos, por lo que los CCDV de tipo T pueden estar involucrados en la patofisiología de estas enfermedades.

No se ha encontrado una función especialmente clara para los CCDV de tipo T en células de músculo esquelético de rata y ratón, en células endoteliales bovinas y de cultivos de humano, en osteoblastos de rata, en células ciliares de epitelio bovino, en fibroblastos de ratón, en células gliales de ratón, en espermatozoides humanos y en células espermatogénicas de ratón. Varios estudios sugieren una importante contribución de los CCDV de tipo T en las vías de transducción de señales que regulan la síntesis de proteínas, la diferenciación celular, el crecimiento y la proliferación. Los CCDV de tipo T se expresan predominantemente en las etapas tempranas de

diferenciación de muchos sistemas neonatales y embriológicos, mientras que tras la maduración su densidad decrece pudiendo incluso desaparecer completamente.

Tabla 2.2- Características electrofisiológicas y farmacológicas de los CCDV de tipo T y de tipo no T (L, N, P, Q, R). En el estudio farmacológico los grados muy alta, alta, media, parcial, baja o No (nula) hacen relación a la selectividad del compuesto por el canal. Esta figura fue modificada de Ertel y col, (1997). Abreviaturas: DHP, dihidropiridinas.

		Tipo T	Tipo no T
Electrofisiología	Voltaje de activación	Bajo	Alto
	Voltaje de inactivación	Bajo	Alto (L,P,Q), medio (N), bajo (R)
	Velocidad de inactivación	Rápida	Lenta (L,N,P,Q), Rápida (R)
	Velocidad de desactivación	Lenta	Rápida
	Inactivación por Ca^{2+}	No	Sí (L,P,R), Sí/No (N)
	Tasa de inactivación dependiente de voltaje	Sí	No
	Conductancia	~6	>10
	Permeabilidad	$\text{Ca}^{2+} = \text{Ba}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$
Farmacología	Cd^{2+}	Baja	Alta (L,N,P,Q,R)
	Ni^{2+}	Alta	Alta (R), baja (L,N,P)
	Mibefradilo	Alta	Media (L,N,R)
	NNC 55-0396	Muy alta	Media/alta (L,N,P,Q,R)
	Agonistas DHP	No	Alta (L), No (N,P,Q,R)
	Antagonistas DHP	Media	Alta (L), baja (N,P,Q,R)
	ω -Ctx-GVIA	No	Alta (N), No/baja (L,P,Q), No (R)
	ω -Ctx-MVIIC	No	Alta (N,P,Q), No/baja (L), No (R)
	ω -Aga-IIIa	No	Alta (L,N,R), parcial (P,Q)
	ω -Aga-IVa	No	Alta (P), media (Q), No/baja (L,N,R)

2.2.3.4 Canales de calcio dependientes de voltaje en la célula cromafín de rata adulta y embrionaria

Varios laboratorios han estudiado la liberación de catecolaminas de las glándulas adrenales de rata embrionaria y neonata, bien en preparaciones de rodajas de médula adrenal o en cultivos primarios de células aisladas; han estimulado las células cromafines con alto K^+ , hipoxia, hipercapnia o acidosis (Bournaud y col., 2001; Bournaud y col., 2007; Munoz-cabello y col., 2005; Rico y col., 2005; Thompson y col., 1997; Thompson y col., 2002). Bounard y col., (2001) encontraron que el 50 % de las CCER expresaban CCDV de bajo umbral de activación o tipo T, mientras que el otro 50 % de las CCER expresaban ambos tipos de canales, CCDV de bajo umbral de activación o tipo T y CCDV de alto umbral de activación (L, N, P/Q o R). Estos investigadores observaron que tan solo los CCDV de alto umbral de activación de las CCER eran capaces de promover la exocitosis.

No se había realizado ningún estudio que estableciera sí un determinado subtipo de CCDV de alto umbral de activación controlaba la secreción de catecolaminas de forma preferente hasta que nuestro grupo de investigación decidimos dar respuesta a esta pregunta, descubriendo que en CCER es el CCDV de tipo L quien controla casi totalmente la respuesta secretora tanto frente al estímulo fisiológico de hipoxia (Fernández-Morales y col., 2013), como frente al estímulo de alto K^+ (Fernández-Morales y col., 2009). Sin embargo tras la maduración postnatal, en células cromafines de rata adulta, la contribución del CDDV de tipo L a la exocitosis ya no es preferencial y tanto los CCDV de tipo L como los de tipo N contribuyen con similar eficiencia al proceso de acoplamiento estímulo-secreción (Kim y col., 1995). Un trabajo controvertido pone de manifiesto como tanto en rodajas de adrenal de rata neonata como rata adulta la hipoxia promueve una respuesta secretora que estaría mediada de forma exclusiva por el Ca^{2+} que entra a través de los CCDV de tipo L, el cual dispararía la liberación de Ca^{2+} del retículo mediante un mecanismo CICR (Takeuchi y col., 2001).

Los CCDV de tipo T están funcionalmente expresados en las células cromafines de rata neonata y también participan en la detección de la hipoxia aguda. En el trabajo de Levitsky y López-Barneo (2009) se demuestra que las células cromafines de rata

neonata responden a hipoxia aguda con un incremento de la secreción de catecolaminas que es inhibido por concentraciones de Ni^{2+} las cuales bloquean de forma reversible los canales T (Cav3.2, α_{1H}). Las células cromafines de rata adulta no expresan CCDV de tipo T o los expresan solo una muy pequeña fracción de células (Hollins e Ikeda, 1996); sin embargo si se las somete a un estímulo de hipoxia crónico se produce una sobreexpresión de este subtipo de canal (Cav3.2, α_{1H}) y una secreción de catecolaminas controlada por este canal (Carabelli y col., 2007). De una forma parecida, las células cromafines de rata adulta sometidas a la incubación crónica durante 3 a 5 días con un derivado permeable de membrana del AMPc (200 μM de pCPT-cAMP) estimula la expresión de canales tipo T sin alterar la expresión ni las características del resto de CCDV de alto umbral de activación (Novara y col., 2004).

2.2.4 Fuentes intracelulares de calcio

Las células cromafines poseen varios compartimientos intracelulares capaces de acumular Ca^{2+} en su interior. Entre estos tenemos al retículo endoplásmico (RE), la mitocondria, y a las mismas vesículas secretoras. La mitocondria —Figura 2.1; (4)— es el principal centro productor de energía de las células eucariotas, son capaces de acumular grandes cantidades de Ca^{2+} en su matriz a través del *uniportador de Ca^{2+} mitocondrial*; la mitocondria usa para conducir el calcio hacia su interior la fuerza motriz del potencial eléctrico que se genera alrededor de la membrana mitocondrial (Reynafarje y col., 1977). La matriz mitocondrial es más electronegativa que el citosol, con una gran diferencia de potencial transmembrana (cerca a -180 mV) el cual es generado por medio de la cadena respiratoria con la consiguiente génesis de ATP.

El Ca^{2+} acumulado en la mitocondria es después liberado al citosol por antiportadores electroneutros que retiran el Ca^{2+} de la matriz mitocondrial al intercambiar un ión Ca^{2+} por dos iones Na^+ a través del intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mNCX). Existe un mecanismo de intercambio Na^+/H^+ aunque es menos activo que el mNCX (Carafoli, 1979; Gunter y Pfeiffer, 1990). De forma parecida a como sucede en el RE, en la mitocondria se ha observado un mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} (mecanismo CICR) mediado por el uniportador mitocondrial (Montero y col., 2001).

Durante la activación celular, algunas mitocondrias cercanas a sitios activos de exocitosis, situadas en la vecindad de los CCDV de la membrana plasmática, atrapan Ca^{2+} de estos microdominios citosólicos de Ca^{2+} cuando los CCDV se abren. En células cromafines de rata, la mitocondria actúa como un rápido y reversible tampón de Ca^{2+} durante la estimulación celular (Babcock y col., 1997; Park y col., 1996); las mitocondrias también contribuyen al aclaramiento de grandes cantidades de Ca^{2+} citosólico en células cromafines bovinas (CCB). La rápida captación de Ca^{2+} por la mitocondria con toda seguridad tiene importantes consecuencias fisiológicas (García y col., 2012). Por ejemplo, la rápida disipación del gradiente de protones por protonóforos disminuye la capacidad de tamponar el Ca^{2+} por las mitocondrias (Montero y col., 2000; Yang y Kao, 2001), y aumenta drásticamente la respuesta exocitótica en células cromafines bovinas estimuladas con pulsos despolarizantes bajo la técnica de patch-clamp en la configuración de fijación de voltaje (Giovannucci y col., 1999). En poblaciones de células cromafines bovinas estimuladas con ACh, cafeína o K^+ , los protonóforos mitocondriales incrementan de 3 a 5 veces la liberación de catecolaminas (Montero y col., 2000; Cuchillo-Ibañez y col., 2002; Cuchillo-Ibañez y col., 2004).

El RE —(Figura 2.1; (3)— posee una gran capacidad de acumular Ca^{2+} por la existencia de una bomba (la ATPasa transportadora de Ca^{2+} de tipo P dependiente de ATP y Mg^{2+}), también llamada Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico o SERCA (Mathiasen y col., 1993). Ésta se localiza en la membrana de dicha organela y transporta el Ca^{2+} desde el citosol, en contra de gradiente, y con gasto de la energía o consumo de ATP, acumulándolo en el lumen del RE; la presencia de dicha bomba permitió entender por vez primera el concepto de almacén de Ca^{2+} intracelular, el cual pronto se extendió a la mayoría de células no excitables y excitables incluyendo neuronas y células neuroendocrinas (Berridge, 1998).

La SERCA permite la formación de un importante gradiente de Ca^{2+} entre el lumen del RE y el citosol ya que la concentración de Ca^{2+} basal en ambos compartimentos es del orden de $\sim 500 \mu\text{M}$ en el lumen del RE (Montero y col., 1995) y $\sim 100 \text{ nM}$ en el citosol (Meldolesi y Pozzan, 1998), lo que habilita a esta organela para ser una potencial fuente de Ca^{2+} . El RE participa en la génesis de señales de Ca^{2+} en innumerables tipos celulares, jugando un rol central en la homeostasia del Ca^{2+}

citoplasmático (García y col., 2006; García y col., 2012; Endo y col., 1970; Fabiato, 1983; Rigual y col., 2002).

El RE posee canales operados por ligando que son regulados por mensajeros intracelulares específicos, que permiten la liberación de Ca^{2+} al citosol (Peterson y col., 1993; Berridge, 1998). Existen dos tipos de canales activados por ligando, los llamados canales activados por inositol 1,4,5-trifosfato o IP3 (IP3R), cuyo principal activador es el IP3, aunque también son regulables por Ca^{2+} ; y los receptores de rianodina (RyR). Estos últimos son activados fundamentalmente por Ca^{2+} , a concentraciones menores que las necesarias para activar al IP3R.

En consecuencia, un aumento del Ca^{2+} citoplasmático provocado por la activación de CCDV y la entrada de calcio por los mismos puede activar por sí solo a los RyR, conduciendo a la salida de dicho catión desde el RE, y contribuyendo por lo tanto a un aumento aún mayor del Ca^{2+} citoplasmático. Es decir que actúa como un mecanismo de amplificación de la señal de Ca^{2+} . Este fenómeno, llamado liberación de calcio inducida por calcio o mecanismo CICR, fue observado por vez primera en células musculares esqueléticas (Endo y col., 1970), y constituye la fuente principal de Ca^{2+} en células musculares cardíacas (Fabiato, 1983). En estos modelos experimentales el subtipo L de canales de calcio tiene un rol preponderante en la activación de estos receptores debido a un íntimo acoplamiento espacial entre las dos proteínas (receptores de rianodina (RyR) y CCDV de tipo L).

Otra posible fuente intracelular de Ca^{2+} son las mismas vesículas secretoras — Fig. 2.1; (9)—. La $[\text{Ca}^{2+}]$ en las vesículas secretoras es de ~40 mM (Winkler y Westhead, 1980). La inmensa mayoría de este Ca^{2+} (>99.9%) está asociado a la matriz vesicular (cromograninas) y sólo el 0.1 % se encuentra como concentración de Ca^{2+} libre dentro de la vesícula (~40 μM) (Bulenda y Gratzl., 1985; Santodomingo y col., 2008). Como mucho el 20-30 % del total del volumen celular se encuentra ocupado por alrededor de 20.000 vesículas cromafines que almacenan alrededor del 60 % de todo el Ca^{2+} celular.

La acumulación del Ca^{2+} se produce a través de una ATPasa sensible a tapsigargina (Santo Domingo y col., 2008) y la liberación de Ca^{2+} hacia el citosol desde las vesículas se observó en células permeabilizadas con la asociación de IP3 y cafeína (Hur y col., 2005). Algunos autores sostienen la posibilidad de que el Ca^{2+} intravesicular pudiera contribuir a su propia liberación (Santo Domingo y col., 2008); sin embargo la relevancia fisiológica de este Ca^{2+} en la exocitosis no ha sido todavía bien estudiada. Hay algunas evidencias de que la liberación de Ca^{2+} vesicular pueda estar involucrada en las lentas etapas previas a la exocitosis, con la finalidad de movilizar vesículas desde el contingente de reserva hasta el contingente de vesículas preparadas para sufrir exocitosis, como sucede con el Ca^{2+} liberado por el RE.

2.2.5 Sistemas de eliminación y regulación del calcio citosólico

Durante el reposo, el Ca^{2+} celular se encuentra acumulado a altas concentraciones en el RE, y es bajo en el citosol. La mitocondria, por otro lado, si bien tiene la capacidad de acumular altas concentraciones de Ca^{2+} , en condiciones normales sólo alcanzaría valores un poco más altos que los citosólicos (Gunter y Pfeiffer, 1990). Frente a un aumento del Ca^{2+} citosólico por la entrada de Ca^{2+} desde las distintas fuentes, la célula debe volver a las condiciones basales. Las células cromafines poseen diversos mecanismos encargados de eliminar el Ca^{2+} del citosol.

La eliminación de Ca^{2+} citosólico a través de la membrana plasmática se debe a la operación conjunta de una bomba de Ca^{2+} ó Ca^{2+} -ATPasa —Figura 2.1; (6)— (expeliendo 1 ión de Ca^{2+} por cada molécula de ATP consumida) y del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática (NCXm) —Figura 2.1; (7)— (facilita la salida de 1 ion de Ca^{2+} por cada 3 iones de Na^+ que entran dentro de la célula), (Pan y Kao, 1997). Estos dos mecanismos funcionando simultáneamente son capaces de disminuir la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica a una velocidad máxima de $0,2\mu\text{M/s}$ en células cromafines de rata a 27°C (Park y col., 1996).

Ambos transportadores contribuyen al mantenimiento de la homeostasia del Ca^{2+} a través de un equilibrio entre la entrada de Ca^{2+} y la salida del mismo (García y col., 2012). La Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática tiene una gran afinidad por el Ca^{2+}

(K_D en el rango de 10^{-7} M), el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática utiliza la energía proveniente del gradiente de Na^+ para lograr retirar el Ca^{2+} del citosol. Sin embargo, cuando el gradiente electroquímico para el Na^+ es revertido como por ejemplo durante la despolarización de la membrana, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pasa a trabajar en forma reversa, desplazando el Na^+ fuera de la célula e introduciendo Ca^{2+} en el interior (Blaustein & Lederer, 1999).

En cuanto al papel del RE en la homeostasis del Ca^{2+} citosólico —Figura 2.1; (3)— cabe citar que de las tres isoformas de la Ca^{2+} ATPasa del RE que existen, en las células cromafines se detectaron dos isoformas de pesos moleculares 116 y 100 kDa que corresponden a los subtipos SERCA 2b y SERCA 3 (Poulsen y col., 1995). Estas ATPasas poseen una estequiometría de 2 Ca^{2+} trasladados desde el citosol al RE por ATP hidrolizado (Villalobos y col., 2002), y presenta una velocidad máxima de transporte de Ca^{2+} ubicada en un rango entre 1 y 1,5 $\mu\text{M}/\text{seg}$.

Como hemos comentado anteriormente; en la mitocondria, el Ca^{2+} es captado desde el citosol a través del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial, que es un sistema de baja afinidad pero de alta capacidad —Figura 2.1; (4)— (Gunter y Pfeiffer, 1990). La acumulación del Ca^{2+} en esta organela puede darse en ciertas condiciones patológica, aconteciendo una importante concentración de Ca^{2+} en la mitocondria que llegaría a alcanzar valores de 5 a 6 órdenes de magnitud sobre el valor de reposo (Bernardi y col., 1999).

Este mecanismo de extracción de Ca^{2+} citosólico por la mitocondria se observó tanto en células cromafines de rata (Babcock y col., 1997) como en células cromafines bovinas (Xu y col., 1997). La velocidad máxima de extracción del Ca^{2+} citosólico se calculó en 160 $\mu\text{M}/\text{seg}$ (Villalobos y col., 2002). La liberación del Ca^{2+} acumulado en la mitocondria se produce a través del ya citado intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mNCX) (Gunter y Pfeiffer, 1990; Gunter y col., 1994). La participación de la mitocondria en el metabolismo del Ca^{2+} celular no es sólo importante en la regulación del Ca^{2+} citosólico; además los cambios transitorios en la $[\text{Ca}^{2+}]$ intramitocondrial participan en la regulación fina de la respiración celular (Gunter y col., 1994). Por otro lado, frente a un aumento importante y sostenido del Ca^{2+} citosólico, el consiguiente

aumento del Ca^{2+} intramitocondrial es parte del proceso que desencadena la apoptosis o la muerte celular programada (Gunter y col., 1994; Duchen, 2000).

Por último se debe mencionar que las células cromafines poseen *tampones endógenos de Ca^{2+}* , tanto fijos como móviles, que cumplen una función muy importante tanto en la regulación de la intensidad como en la distribución espacial y temporal de las señales de Ca^{2+} —Figura 2.1; (2)— (O’Sullivan y col., 1989; Zhou y Neher, 1993; Xu y col., 1997; Marengo y Monck, 2003). Durante la activación de los CCDV se genera un aumento en la concentración de Ca^{2+} cercano a la membrana plasmática que puede alcanzar concentraciones de entre 10 μM y 100 μM (Augustine y Neher, 1992; Neher, 1998a); estos microdominios de Ca^{2+} pueden ser detectado por sondas de Ca^{2+} fluorescentes (Neher y Augustine, 1992; Marengo y Monck, 2000).

La difusión del Ca^{2+} hacia el citosol y la presencia de *tampones endógenos de Ca^{2+}* aceleran la disipación del gradiente de Ca^{2+} , restringiéndolo en el tiempo y en el espacio (Neher, 1998). Los *tampones* de Ca^{2+} y la difusión del mismo en células cromafines bovinas han sido estudiados extensamente por el grupo de investigación de Erwin Neher y colaboradores. Sin embargo, la naturaleza molecular de los tampones de Ca^{2+} citosólico no está muy bien conocida; solo hay unos cuantos estudios sobre las proteínas de unión a Ca^{2+} en células cromafines. Por ejemplo en CCB la parvalbúmina contiene sitios mixtos de unión a Ca^{2+} y Mg^{2+} que muestran una lenta cinética de unión al Ca^{2+} bajo condiciones fisiológicas; la parvalbúmina actúa como una fuente de Ca^{2+} durante la relajación de los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y extiende los transientes de Ca^{2+} citosólico que pasan de tener una cinética de aclaramiento monoexponencial a una biexponencial (Lee y col., 2000). En otro estudio se demostró que la calbindina-D28K se encuentra distribuida homogéneamente en el citosol de CCB mientras que en células cromafines de ratón estaba distribuida preferentemente en las inmediaciones de la membrana plasmática. El aclaramiento de los transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ evocados por K^+ fue más lento en CCB y la respuesta secretora inicial fue más rápida en células cromafines de ratón; la distinta distribución de calbindina-D28K indudablemente afecta a las señales de Ca^{2+} y la exocitosis en ambos tipos de células cromafines (Alés y col., 2002).

2.2.6 La exocitosis en la célula cromafín

La exocitosis es el proceso de fusión de una vesícula lipídica intracelular a la membrana plasmática, que puede involucrar la secreción al espacio extracelular de diferentes tipos de moléculas contenidas en dichas vesículas. Este proceso está presente en todas las células eucariotas y se genera a través de mecanismos muy conservados. Todas las células presentan una exocitosis de tipo constitutiva, que forma parte del normal reciclado de lípidos y proteínas entre la membrana plasmática y el interior de la célula. Esta *exocitosis constitutiva* es activa con los bajos niveles de Ca^{2+} del citosol que hay cuando la célula se encuentra en reposo (Jahn y col., 2003, Sorensen, 2004).

Por otro lado, la secreción de mensajeros químicos como neurotransmisores u hormonas, que se observa tanto en terminaciones nerviosas como en células endocrinas y neuroendocrinas, depende en cambio de una *exocitosis finamente regulada* por la concentración del Ca^{2+} citosólico, el cual debe superar ciertos valores críticos para activarla. Por lo tanto, para disparar este mecanismo es necesaria la elevación del Ca^{2+} intracelular, fenómeno que se produce fundamentalmente como consecuencia de la apertura de los CCDV, fisiológicamente activados ante la propagación de PA (Augustine y Neher, 1992a). Si bien las *exocitosis constitutiva* y la *regulada por Ca^{2+}* cumplen funciones distintas, los pasos que deben cumplir las vesículas antes de fusionarse son los mismos en ambos casos.

El primer paso que se debe cumplir para que una vesícula pueda fusionarse con la membrana plasmática es el *docking* o atraque, en el cual las vesículas se aproximan a la membrana plasmática estableciendo contacto con ésta (Figura 2.4B, C). La definición de este proceso presenta contradicciones en la literatura, ya que algunos autores aplican definiciones morfológicas, y otros autores definiciones a nivel molecular. Las primeras se basan en *estudios de microscopía electrónica* y se refieren a las vesículas que se encuentran próximas a la membrana plasmática, a una distancia inferior a 200 nm (Ashery y col., 2000). Sin embargo, dado que las células cromafines poseen una enorme cantidad de vesículas, parecería que esta definición es muy poco precisa e involucraría una población muy heterogénea de las mismas. Otros autores sugieren que las vesículas atracadas son aquellas en las que ciertas *proteínas vesiculares interactúan con otras de*

la membrana plasmática, aunque no existe consenso sobre cuáles serían dichas proteínas.

En algunos trabajos se postuló que la sinaptotagmina, la syntaxina y la neurexina1 intervendrían en el atraque de las vesículas (Pevsner y col., 1994). Mientras que trabajos más recientes, utilizando ratones transgénicos, aportaron evidencias que sugieren que la proteína Munc18 sería también un firme candidato para este proceso (Nili y col., 2006; Sorensen, 2009); estos autores observaron que la delección del gen de Munc18 induce una gran reducción del número de vesículas ancladas a la membrana plasmática y una pérdida total de la secreción en células cromafines (Voets y col., 2001).

Otras proteínas que estarían involucradas en el atraque de las vesículas a la membrana plasmática son la proteína Rab3 y la proteína RIM (del inglés, Rab3-interacting molecule) (Coppola y col., 2001). Las proteínas Rabs son pequeñas GTPasas que se ligan a la membrana de las vesículas secretoras mediante grupos hidrofóbicos ubicados en el C terminal. La proteína Rab3 se expresa en el cerebro asociada a vesículas sinápticas (Schluter y col., 2002) y en las vesículas secretoras de las células cromafines (Lin y col., 1997). La proteína Rab3A, en su forma unida a GTP se inserta en la membrana vesicular y reconoce a la proteína RIM que se encuentra en la membrana plasmática (Dulubova y col., 2005; Schoch y Gundelfinger 2006). En particular, en células cromafines, se sugirió que Rab3 promueve el atraque de las vesículas a la membrana plasmática (van Weering, y col., 2007).

Posterior al atraque, las vesículas secretoras deben sufrir un proceso de activación (o *priming*). En este proceso las vesículas ya atracadas adquieren la capacidad de fusionarse frente a una señal de Ca^{2+} apropiada. La activación es un proceso complejo que involucraría varias reacciones, y que según el consenso general requiere ATP (Holz y col., 1989). Este proceso conduce finalmente a la formación/maduración del complejo SNARE (por *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*), que es el complejo proteico involucrado en la fusión vesicular. La formación del complejo SNARE implica la interacción entre proteínas de la membrana plasmática (t-SNARE) y proteínas de la membrana vesicular

(v-SNARE) (Jahn y Sudhof 1999; Chen y Scheller 2001; Bruns y Jahn, 2002) (Figura 2.4A, B). En las sinapsis de neuronas y en células neuroendocrinas, el v-SNARE está constituido por la proteína sinaptobrevina, la cual forma un complejo estable con las proteínas del t-SNAREs, SNAP-25 y syntaxina, que se ubican en la membrana plasmática de las células (Figura 2.4A, B). La cristalización del complejo SNARE reveló la existencia de cuatro α hélices: Una de syntaxina, una de sinaptobrevina y dos de SNAP-25 (Sutton y col., 1998) —Figura 2.4A, B—. También se han identificado diversas proteínas accesorias que están involucradas en la regulación, reciclado, y/o formación del complejo SNARE, como NSF, Munc13, Munc18 y otras.

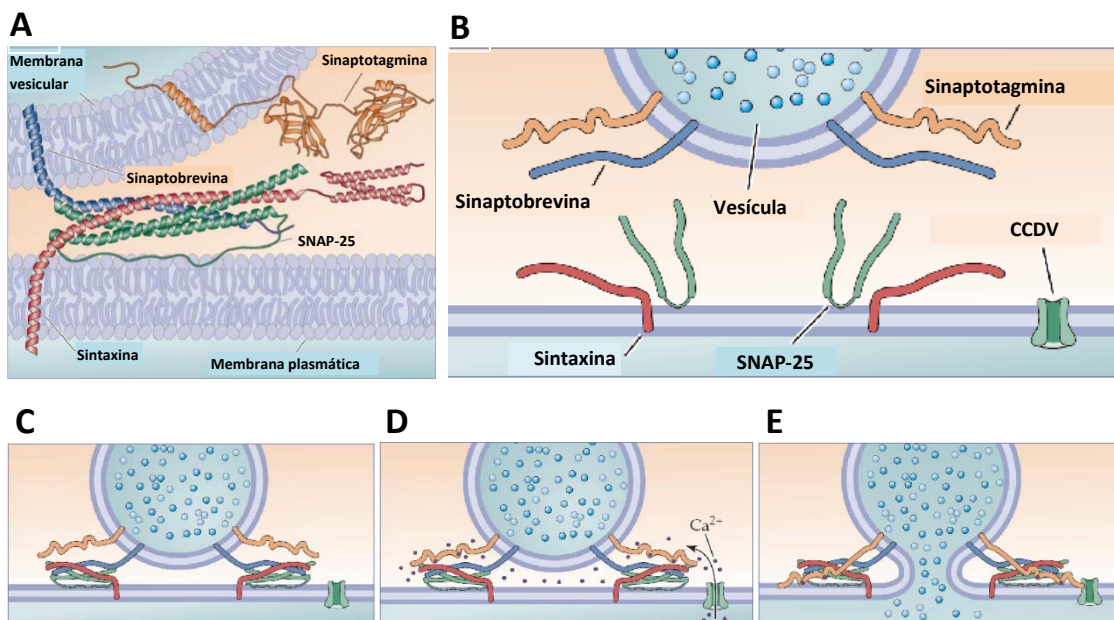


Figura 2.4- Proceso de atraque y activación de las vesículas en la exocitosis regulada por Ca^{2+} . A.- Modelo esquemático de localización de las distintas proteínas implicadas en la formación del complejo SNARE entre la vesícula y la membrana plasmática. B.- Localización de las proteínas del v-SNARE de la vesícula (sinaptobrevina y sinaptotagmina), del t-SNARE de la membrana plasmática (syntaxina y SNAP-25) y de los CCDV implicados en el proceso de fusión cerca de las proteínas del t-SNARE. C.- Etapa inicial del proceso de activación o *priming* donde ocurre el emplazamiento y alineación de las proteínas del complejo SNARE y el consiguiente “entrelazado en cremallera” o *zippering*. D.- El Ca^{2+} que entra por los CCDV más próximos es el responsable de promover la fusión vesicular; la sinaptotagmina-1 vesicular actúa como sensor de Ca^{2+} . E.- Formación del poro de fusión y liberación parcial o total del contenido vesicular. Modificado de Stein y col., (2007).

Durante el proceso de activación o *priming* ocurren diversos eventos que conducen finalmente al emplazamiento y alineación de las proteínas del complejo SNARE, favoreciendo la interacción de los componentes protéicos entre sí (Figura 2.4C). Un aspecto clave en el ensamblaje productivo del complejo de fusión es la adopción de una configuración *trans* en la que al menos una proteína SNARE se encuentra en cada una de las membranas destinadas a fusionarse (Fig. 2.4C).

El complejo así formado sufre un proceso activo desde el punto de vista energético llamado *zippering* o “entrelazado en cremallera”; se produce así el entrecruzamiento de los motivos SNARE como si de una cremallera se tratase, empezando por el extremo N terminal y terminando en el C terminal de las α hélices proteicas (Fig. 2.4A,C) (Borisovska y col., 2005, Sorensen y col., 2006), al tiempo que se genera la fuerza suficiente para aproximar las dos membranas (plasmática y vesicular) y vencer las barreras energéticas para su fusión, reduciendo así la energía de activación necesaria para la fusión de ambas membranas, que es de por sí un proceso espontáneo (Jahn y col., 2003).

La aproximación íntima de las membranas incrementa marcadamente la probabilidad de fusión entre ambas llevando a la formación del *poro de fusión* (Han y col., 2004), que establece conexión entre los medios extracelular e intravesicular. Este proceso se realiza en dos pasos: primero las membranas se aproximan, venciendo las fuerzas electrostáticas y posteriormente se desestabilizan las porciones hidrofílica e hidrofóbica de la bicapa lipídica. Todas estas transiciones están gobernadas por fuerzas que minimizan la exposición de las superficies no polares de las bicapas lipídicas al medio acuoso (Markin y Kozlov, 1983; Chernomordik y col., 1987).

Una de las últimas etapas tras la activación vesicular o *priming* consiste en el reciclado de los complejos SNARE que han sido ya utilizados. Este es un proceso dependiente de ATP en el que intervienen las proteínas NSF y SNAP. La proteína NSF es una chaperona que utilizando la energía de hidrólisis del ATP y sirviéndose de la proteína SNAP como cofactor catalizaría el proceso que promueve la disociación de los complejos SNARE tras finalizar el proceso exocitótico. Esto permitiría la reutilización de las proteínas SNARE en un nuevo proceso de fusión (Sollner y col., 1993; Kibble y

col., 1996). Tras suceder esta reacción ATP-dependiente, acontece en la reactivación de los complejos SNARE otras reacciones en las que participaría el Ca^{2+} , Munc18, Munc13 y otras proteínas (Sorensen y col., 2003; Borisovska y col., 2005). Por mencionar un ejemplo se postula que munc13 favorecería el paso de la syntaxina desde una conformación cerrada a una abierta, necesaria para la siguiente nueva formación del complejo SNARE (Sassa y col., 1999).

En el caso de la *exocitosis regulada por Ca^{2+}* , los eventos de atraque y activación son etapas necesarias para que las vesículas alcancen el estado de maduración final y estén preparadas para fusionarse. Sin embargo, la fusión vesicular ocurrirá solamente con alta probabilidad cuando el aumento citosólico de Ca^{2+} supere cierto valor umbral (1-10 μM) en la región próxima a las vesículas (Sugita, 2008) —Fig. 2.4D—. En estos casos particulares la fusión requiere, además de la presencia de las proteínas SNARE, de la existencia de un sensor de Ca^{2+} . Existen ya evidencias claras de que la familia de las sinaptotagminas es la que cumple esta función (Perin y col., 1990). En particular para la exocitosis rápida asociada a terminales sinápticos (Geppert y col., 1994) y aparentemente también para las vesículas secretoras de las células cromafines (Voets y col., 2001a), el candidato es la sinaptotagmina-1.

En general, la sinaptotagmina es una proteína vesicular que posee cuatro sitios de unión a iones Ca^{2+} , que al ser ocupados por el ión, llevan a la activación de la proteína favoreciendo la interacción de esta con la syntaxina (Bennett y col., 1992) y con ciertos lípidos de la cara interna de la membrana plasmática (Brose y col., 1992). Este último proceso, conjuntamente con el *zippering* o “entrelazado en cremallera” (Sutton y col., 1998) del complejo SNARE llevaría a la formación del poro de fusión —Fig. 2.4E— (Sugita, 2008). El fin de este proceso conduce a la liberación del contenido vesicular (Fig. 2.4E), ya sea a la hendidura sináptica (en el caso de neuronas) o a la circulación sanguínea (en el caso de las células cromafines y resto de células neuroendocrinas).

Una vez generado el poro de fusión la exocitosis puede seguir dos vías distintas. Una de ellas puede llevar a la fusión completa de la vesícula con la membrana plasmática y la otra a un proceso de fusión transitoria. En el primer caso el poro de

fusión se expande llevando a una integración total de la membrana vesicular con la membrana plasmática (*fusión completa*) —Figura 2.5A y 2.5B—. En cambio, en una *fusión transitoria* el poro de fusión permanece abierto durante un cierto tiempo, y luego vuelve a cerrarse, provocando que la vesícula se recupere en el mismo sitio de fusión sin perder su identidad, sufriendo la exocitosis de parte de su contenido. A este proceso de exocitosis/endocitosis acopladas se la denomina generalmente “*kiss and run*” (parpadeo). Sin embargo varios autores han definido diferentes tipos de fusión transitoria de acuerdo al tiempo de apertura, conductancia y grado de selectividad del poro de fusión, como es el “parpadeo o *kiss and run*” propiamente dicho, el “*stand alone foot*” y la “*cavicapture*” (Cárdenas y Marengo, 2010).

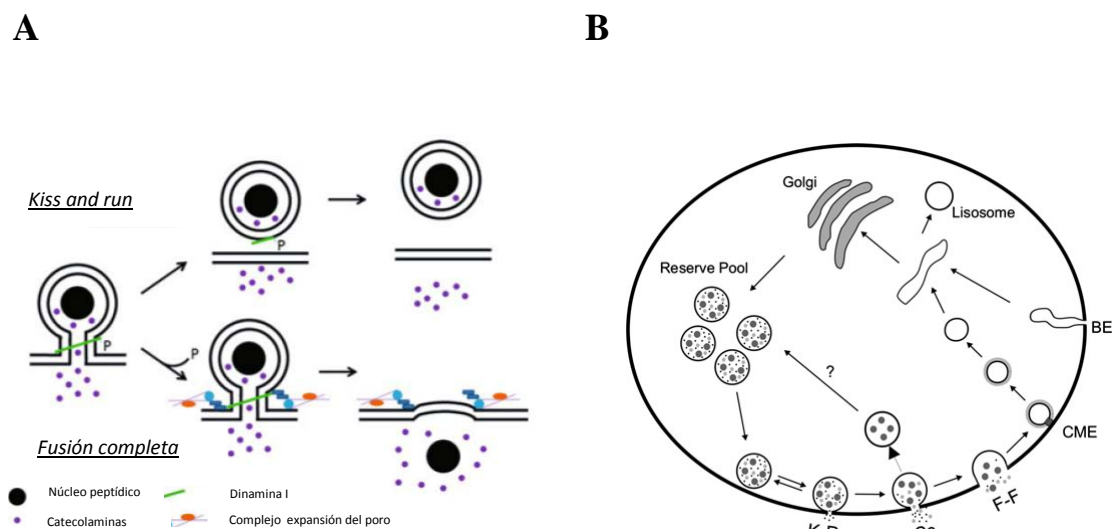


Figura 2.5- Modelo esquemático mostrando los diferentes modos de exocitosis y endocitosis en la célula cromafín. A.- La vía superior muestra la exocitosis como fusión transitoria de tipo “kiss and run” (parpadeo) mientras que en la vía inferior se muestra una exocitosis de fusión completa, donde la desfosforilación de la dinamina I permite el reclutamiento del complejo de expansión del poro y la exocitosis de todo el contenido vesicular. B.- Distintos tipos de exocitosis: “Kiss and run” (K-R), “Cavicapture” (Cc), “Fusión completa” (F-F) y endocitosis: “endocitosis mediada por clatrina” (CME), “endocitosis pasiva” (BE). Adaptado de Chan y col., 2010; Cárdenas y Marengo, 2010).

Los eventos de fusión transitoria del tipo “*kiss and run*” se caracterizan por una breve dilatación del poro de fusión (tiempo de apertura media del poro de fusión de 41 ms) acompañada de una rápida liberación de una parte de las catecolaminas que contiene la vesícula cromafín, retrayéndose la vesícula cromafín tras el evento

manteniendo la totalidad e integridad de su membrana vesicular (Figura 2.5A y 2.5B); este tipo de evento exocitótico adquiere una forma similar a una espiga amperométrica. El tamaño cuántico de estos eventos puede ser similar a los observados durante los eventos de fusión completa (Alés y col., 1999). El segundo tipo de fusión transitoria, conocido como “*stand-alone foot*” se caracteriza por la lenta liberación de catecolaminas (tiempo de apertura media del poro de fusión de 445 ms) a través de un poro de fusión estrecho con niveles grandes de conductancia de 500-600 pS (Albillos y col., 1997; Ales y col., 1999).

Algunas células cromafines que liberan diferencialmente neuropéptido-Y y activador tisular del plasminógeno, se corresponden con eventos de fusión transitoria con una liberación del contenido de catecolaminas parcial, donde el poro de fusión aparentemente falla al expandirse (Alés y col., 1999). Sin embargo, la mayoría de las vesículas cromafines liberan neuropéptido-Y al tiempo que retienen el activador tisular del plasminógeno; a este modo de exo-endocitosis que selectivamente libera péptidos y proteínas se le ha llamado “*cavicapture*”, donde la cavidad de la vesícula es recuperada intacta (Taraska y Almers, 2004) (Fig 2.5B). Este tipo de fusión transitoria se ha encontrado en células secretoras de insulina (Tsuboi y col., 2004) y en células de la pituitaria anterior (Ferraro y col., 2005).

2.2.6.1 La cinética de la respuesta secretora y los distintos contingentes de vesículas

Desde el momento en que una vesícula secretora se forma hasta que libera su contenido al exterior celular ésta debe pasar por muchas etapas: (1) Biogénesis de la vesícula sináptica a partir de endosomas tempranos en el aparato de Golgi; (2) Acumulación del neurotransmisor u hormona en el interior vesicular; (3) Aproximación a la membrana plasmática transportada por el citoesqueleto; (4) Habilidad o activación de la vesícula para sufrir fusión; (5) Fusión y formación de un poro que conecta el interior de la vesícula con el espacio extracelular; (6) Apertura completa del poro de fusión y (7) Endocitosis y recaptación de membrana vesicular para la posterior síntesis de vesículas (Bittner y Holz, 1992; Neher y Zucker, 1993). Esta compleja secuencia de procesos hace que en la célula cromafin se

establezcan distintos *contingentes vesiculares* que se localizan a lo largo de las distintas etapas de maduración de la vesícula.

Para evidenciar la existencia de estos *contingentes vesiculares* es necesario en primer lugar disparar la exocitosis celular con una concentración homogénea de Ca^{2+} en todo el citoplasma de modo que no se generen diferencias de respuesta asociadas a la distribución espacial de las vesículas. En segundo lugar se debe utilizar una técnica de registro de la exocitosis de alta resolución temporal, que permita diferenciar los *contingentes maduros* anclados a la membrana de los *inmaduros*. Una de las grandes dificultades para el estudio de la dependencia del Ca^{2+} en el proceso de exocitosis ha sido la imposibilidad de mantener constante la concentración de Ca^{2+} intracelular. Sin este control de la concentración no es posible realizar estudios de dosis respuesta y, por tanto, obtener información cinética de la exocitosis.

Desde la introducción de la técnica de *patch-clamp* es posible dializar el citosol de una célula con soluciones que contienen distintas concentraciones de Ca^{2+} y por tanto estudiar la dependencia de Ca^{2+} de la exocitosis. Más recientemente se han desarrollado técnicas que permiten no sólo introducir una solución con concentración conocida de Ca^{2+} , sino además permiten elevar la concentración de este ion a distintos niveles. El método más utilizado es el de liberar iones Ca^{2+} de compuestos enjaulados (*caged compounds*). Estos compuestos enjaulados son molecularmente muy similares a compuestos que tamponan Ca^{2+} como el EGTA, pero poseen la peculiaridad que frente a un estímulo intenso de luz (*flash*) estos compuestos se desintegran y pierden su afinidad por los iones Ca^{2+} , provocando una liberación masiva de los mismos en el citosol.

Esta técnica llamada en inglés *Ca^{2+} flash photolysis* o “fotoliberación de Ca^{2+} de compuestos enjaulados” permite obtener una señal de Ca^{2+} espacialmente uniforme (Morad y col., 1988). El compuesto enjaulado más utilizado ha sido el dimetoxi-nitrofen (dimethoxy-nitrophen ó DM-Nitrophen), que permite liberaciones de Ca^{2+} controlables en función de la intensidad y duración del *flash* de luz. Con esta técnica, se puede incrementar en una determinada célula la concentración de Ca^{2+} intracelular a un nivel conocido para poder así estudiar el fenómeno secretor con la utilización de técnicas de

medida de la superficie de membrana (medidas de capacidad de membrana mediante *patch-clamp*) o la determinación electroquímica de productos de secreción (*amperometría*).

La técnica con mayor resolución para estudiar la exocitosis es la de la medida de la capacidad eléctrica de la membrana (técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula entera) (Neher y Marty, 1982). Esta técnica se basa en la relación directa que existe entre la capacidad eléctrica de la membrana plasmática de actuar como un condensador y la superficie de membrana celular. Por tanto, cuando tiene lugar la exocitosis, que produce un incremento neto en la superficie de membrana celular al incorporarse la membrana vesicular a la membrana plasmática, se produce un incremento de la capacidad eléctrica de la membrana. Con esta técnica se pueden medir fusiones de vesículas únicas de hasta 50 nm de diámetro. Hasta ahora, estas poderosas técnicas no se han podido utilizar en una terminación sináptica en el sistema nervioso de mamíferos debido a su reducido tamaño. La información sobre los distintos *contingentes vesiculares* se ha obtenido hasta el momento en células neuroendocrinas como la célula cromafín.

Los experimentos realizados con las técnicas anteriormente citadas en células cromafines determinaron la existencia de dos componentes claramente diferenciables cinéticamente en las medidas de incremento de la capacidad eléctrica de la membrana celular: uno rápido que tiene una duración de menos de un segundo y al cual se lo denominó *exocitosis rápida* (del inglés *exocytotic burst*), y otro *lento* y sostenido que evoluciona durante muchos segundos (Heinemann y col., 1994). Mientras que el primero se asoció a vesículas preparadas para liberarse, más próximas a la membrana y más competentes para la fusión que ya han experimentado el atraque y la activación, al segundo se lo considera la manifestación cinética de un *contingente de vesículas* de reserva (RP, del inglés *reserve pool*), compuesto por vesículas inmaduras que deben activarse antes de sufrir exocitosis (Figura 2.6).

El RP representa el *contingente vesicular* más grande en las células cromafines y contiene entre 2000-5000 vesículas (Sorensen, 2004; Heinemann y col., 1994). Se ha determinado que el RP se compone mayormente de vesículas no atracadas a la

membrana (Figura 2.6) y de una menor fracción de vesículas ya ancladas, a la que se denominó UPP (*unprimed pool*), es decir un grupo de vesículas que ya se han anclado pero que aún no se han activado (Ashery y col., 2000) —Figura 2.6—. La existencia de este último *contingente vesicular* se evidenció a partir de la comparación del tamaño del *contingente de reserva* (calculado por mediciones de capacidad de la membrana) con el número de vesículas atracadas morfológicamente a la membrana plasmática, observado por microscopía electrónica (Ashery y col., 2000).

Una mejora en la resolución temporal de los registros obtenidos con la técnica de *patch-clamp* permitió identificar dentro de la exocitosis rápida (*exocytotic burst*) dos componentes diferenciables, que se interpretaron como la existencia de dos contingentes de vesículas con distintas cinéticas de liberación: Un contingente de movilización rápido, al cual se le denominó *contingente de vesículas* preparadas para liberarse (RRP, *ready releasable pool*) —Fig 2.6— y otro más lento al cual se hizo referencia como SRP —*slowly releasable pool*— (Heinemann y col., 1994; Voets y col., 1999) —Figura 2.6—.

Las diferencias a nivel molecular entre las vesículas que componen estos dos contingentes no están claras actualmente; hay datos que apuntan que podría deberse a que poseen sensores de Ca^{2+} diferentes con distinta afinidad por el catión (Voets, 2000; Voets y col., 2001a). A medida que se va completando de vesículas el RRP se produce un vaciado del SRP (Voets y col., 1999); por esta razón se ha establecido la posible existencia de una ubicación secuencial, una interconexión entre ambos contingentes en la que se produce un intercambio de vesículas entre uno y otro (Heineman y col., 1994; Voets y col., 1999; Sorensen, 2004) —Fig 2.6—. El tamaño del SRP y del RRP se corresponde con aproximadamente 130-150 vesículas cada uno (Voets y col., 1999; Becherer y Rettig, 2006). Estos dos *contingentes* (SRP y RRP) serían rellenados desde el *contingente de vesículas* atracadas pero no activadas, es decir de vesículas que provienen del UPP.

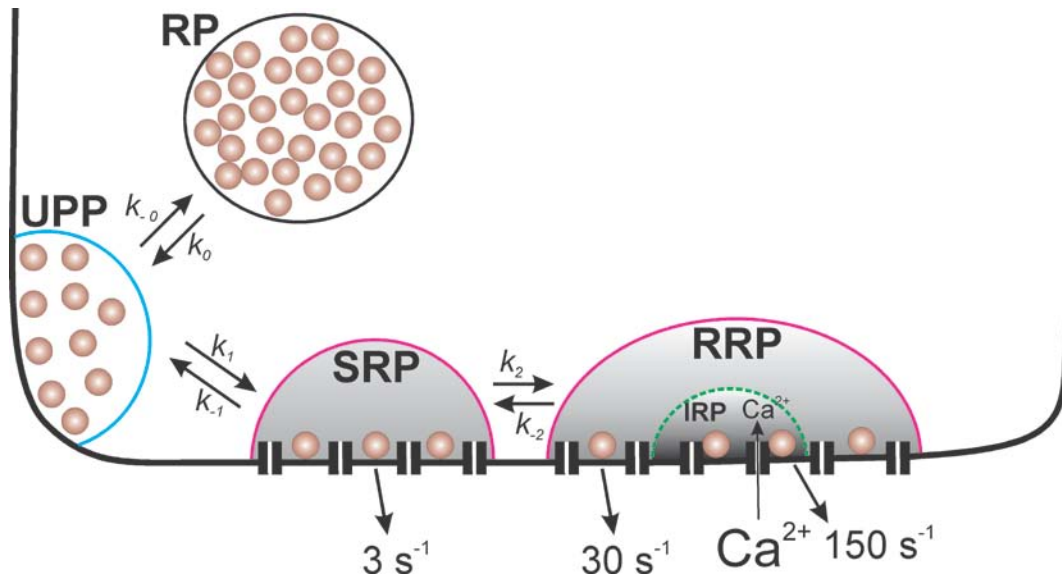


Figura 2.6- Modelo esquemático mostrando los diferentes *contingentes de vesículas* en la célula cromafín. En experimentos realizados con la técnica de liberación de iones Ca^{2+} de compuestos enjaulados por estímulos intensos de luz (flash photolysis of Ca^{2+} caged compounds) se observó que dentro de la respuesta exocitótica inicial ó exocitosis rápida (*exocytotic burst*) se podían distinguir dos *contingentes de vesículas* con distintas cinéticas. La respuesta más rápida se asoció al RRP (del inglés, *ready releasable pool*) y la más lenta al SRP (del inglés, *slowly releasable pool*). Dentro del primer *contingente de vesículas rápidas* (RRP) se diferencia un subconjunto de vesículas que se encuentra más acoplado al estímulo secretor por su proximidad a los CCDV (canales representados en negro), que se denomina IRP (del inglés, *immediately releasable pool*). El *contingente de vesículas* denominado UPP (*unprime pool*) está compuesto por vesículas que han sufrido el anclaje a la membrana plasmática pero que no han sido activadas y por último el *contingente* RP (*reserve pool*) por vesículas inmaduras que se encuentran alejadas de la membrana plasmática. Adaptación propia, inspirado en Ashery y col., (2000) y Voets y col., (1999).

Pese a los importantes avances que produjo la utilización de la técnica de liberación de iones Ca^{2+} de compuestos enjaulados por estímulos intensos de luz (flash photolysis of Ca^{2+} caged compounds) para la determinación de los distintos *contingentes vesiculares*, esta técnica no permite discriminar las vesículas según la distancia de las mismas con la fuente fisiológica de Ca^{2+} ; dado que el Ca^{2+} proviene de fuentes precisas, este aspecto puede ser muy importante en cuanto a la determinación de diferencias en la probabilidad de sufrir exocitosis entre las vesículas ya maduras. Por ejemplo, se ha calculado que las vesículas más cercanas a los canales de Ca^{2+} deben experimentar necesariamente una $[\text{Ca}^{2+}]_c$ mucho más alta que las vesículas distantes cuando dichos canales son activados —Figura 2.7— (Neher, 1998b).

Por lo tanto, tales vesículas se deberían liberar más rápidamente frente a un estímulo adecuado (Figuras 2.6 y 2.7). Cuando se indujo la liberación del RRP por un tren de despolarizaciones cortas, o por despolarizaciones individuales de duración creciente, se ha conseguido identificar un *subcontingente de vesículas* altamente acoplado al estímulo, que se engloban dentro del total de vesículas que conforman el RRP. A este *contingente* se le denominó *contingente de vesículas inmediatamente liberables* (IRP; del inglés, *immediately releasable pool*) (Horrigan y Bookman, 1994; Voets y col., 1999) —Figura 2.6 y Figura 2.7—.

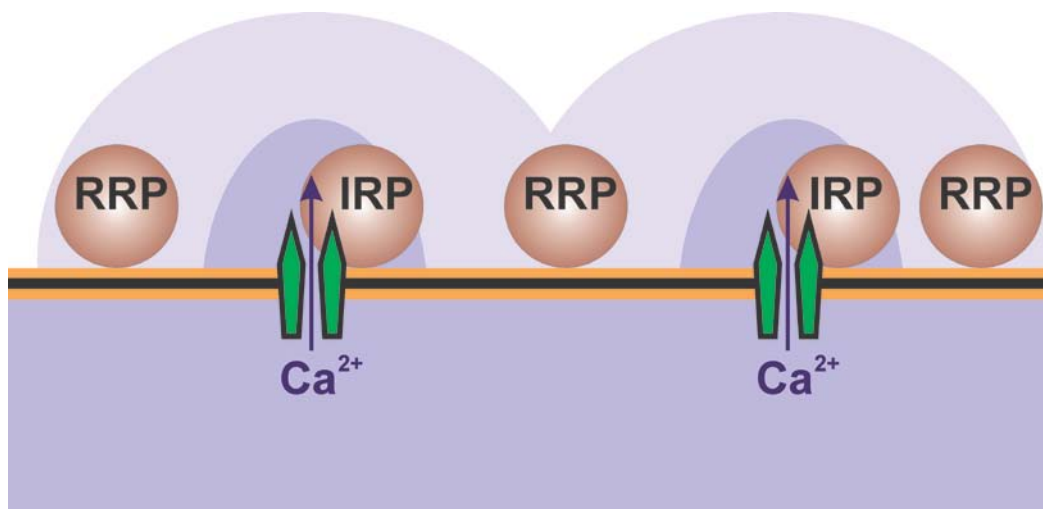


Figura 2.7- Modelo esquemático mostrando los *contingentes de vesículas* que componen el IRP y el RRP en la célula cromafín. Las vesículas que componen el IRP se encuentran ubicadas en la proximidad de los CCDV (vesícula marcada con IRP), y por lo tanto están expuestas a una concentración de Ca^{2+} alta (violeta oscuro) pudiendo generarse su liberación con despolarizaciones de corta duración. Las vesículas ubicadas a distancias mayores de los CCDV (marcadas como RRP) están expuestas a una concentración de Ca^{2+} menor frente a cortas despolarizaciones (violeta claro) y necesitan por lo tanto despolarizaciones más prolongadas que generen una mayor entrada de Ca^{2+} para poder ser liberadas. Figura inspirada de la figura 6 de Rettig y col. (1997).

Este pequeño *contingente de vesículas* (IRP), que contiene un total de aproximadamente 20 vesículas (~25% del RRP), tiene una tasa de liberación 5 veces más rápida que la del RRP (Figura 2.6 y Figura 2.7). Se ha estimado que el IRP en célula cromafín de rata adulta en cultivo primario es de aproximadamente 33.9 femtofaradios (fF), un 10 % del total de lo que supone el RRP (Horrigan y Bookman, 1994), considerando que una vesícula de tamaño medio mide ~2 fF, el IRP en célula cromafín de rata adulta estaría compuesto por un total de aproximadamente 17 vesículas. En esta tesis aportamos nuevas evidencias sobre el tamaño del IRP en célula

cromafín de rata adulta (particularmente en CCM) y por vez primera se ha medido dicho *contingente* en CCRE.

2.2.6.2 Acoplamiento entre los distintos subtipos de CCDV y las vesículas secretoras

Todos los subtipos de CCDV mencionados anteriormente en esta introducción (secciones 1.2.3.2 y 1.2.3.3) pueden contribuir a la liberación de los productos de secreción de células cromafines si se aplica un estímulo adecuado. Se observó que frente a fuertes despolarizaciones (de larga duración e intensidad) los distintos subtipos de CCDV contribuyen a la secreción de forma proporcional a la corriente de Ca^{2+} que atraviesa por cada uno de ellos, dependiendo esto último de la densidad relativa de cada subtipo de canal (Kim y col., 1995; Engisch y Nowycky, 1996; Lukyanetz y Neher, 1999; Aldea y col., 2002). Por lo tanto se puede concluir que la secreción en este caso está determinada por la acumulación de Ca^{2+} citosólico sin importar el subtipo de canal de Ca^{2+} activo. Este tipo de estimulación relativamente fuerte, no sólo libera las vesículas del IRP sino que también provoca la liberación de las demás vesículas del RRP (Horrigan y Bookman 1994; Voets y col., 1999; Álvarez y col., 2008).

Pero esto que hemos comentado anteriormente frente a estimulaciones más fisiológicas puede no ser así, existen algunas evidencias de que el subtipo de canal R está altamente acoplado a la exocitosis en *rodajas* de médula adrenal de ratón (Albillos y col., 2000). Sin embargo existen mayor cantidad de publicaciones que sugieren que sería el canal P/Q el que está mayormente acoplado a la exocitosis. Por ejemplo, Lara y col. (1998) mostraron que el grado de inhibición que produce el bloqueante del canal P/Q ω -agatoxin-IVA es marcadamente mayor a baja concentración de Ca^{2+} externo (0,5 mM) que a altas (5 mM) (Lara y col., 1998). Otros autores encontraron en ratones *knock-out* para el canal P/Q, como la corriente de Ca^{2+} en estas células era completamente compensada por una sobreexpresión de CCDV tipo L, pero la eficiencia con que estas corrientes inducían exocitosis era significativamente menor que en las células provenientes de ratones control (Aldea y col., 2002). Se ha observado que en terminaciones motoras de ratas en distinto estadio de desarrollo (ratas adultas o neonatas) los subtipos de CCDV acoplados a la exocitosis son distintos (Nudler y col.,

2003): En terminaciones de nervio motor de ratas adultas sólo los CCDV de tipo P/Q median la liberación de neurotransmisor, mientras que en terminaciones nerviosas de ratas neonatas ambos CCDV de tipo N y P/Q se encuentran en el mismo sitio activo de exocitosis y median la liberación de neurotransmisor.

En médula adrenal bovina la liberación de adrenalina esta preferentemente controlada por el CCDV de tipo Q mientras que la liberación de noradrenalina esta acoplada al control del CCDV de tipo L (Lomax y col., 1997). En células cromafines de gato es el CCDV de tipo L el que se encuentra acoplado con mayor eficiencia al proceso estímulo-secreción (López y col., 1994). En células cromafin de rata adulta se observó que no hay diferencias en la eficiencia para producir la exocitosis entre los CCDV de tipo L y N (Kim y col., 1995). Como parte fundamental de esta tesis, en CCER hemos demostrado que el CCDV de tipo L estaría acoplado morfológica y/o funcionalmente para contribuir con una mayor eficiencia a la respuesta secretora tanto frente a fuertes estímulos despolarizantes de alto potasio (Fernández-Morales y col., 2009) como frente a estímulos fisiológicos como es el estímulo de hipoxia (Fernández-Morales y col., 2013). La pregunta que nos hacemos es como puede plantearse desde un punto de vista molecular la interacción entre subtipos particulares de CCDV y vesículas secretoras.

En terminaciones presinápticas del sistema nervioso central se demostró que la subunidad $\alpha 1A$ de los CCDV del subtipo P/Q poseen una secuencia aminoacídica llamada *synaptic protein interaction site* (*synprint*), en castellano, sitio de interacción de proteínas sinápticas, que se encuentra ubicada en el *bucle intracelular* de la subunidad $\alpha 1A$, entre los dominios II y III (Sheng y col., 1998) —Figura 2.8—. Ha sido ampliamente demostrado que el *synprint* es capaz de interactuar con proteínas de la maquinaria exocitótica (Figura 2.8) tales como syntaxina, SNAP-25 y synaptotagmina (Rettig y col., 1996; Jarvis y Zamponi, 2005) y otras proteínas sinápticas como la proteína CSP (*cysteine string protein*) y RIM (Davies y Zamponi, 2008).

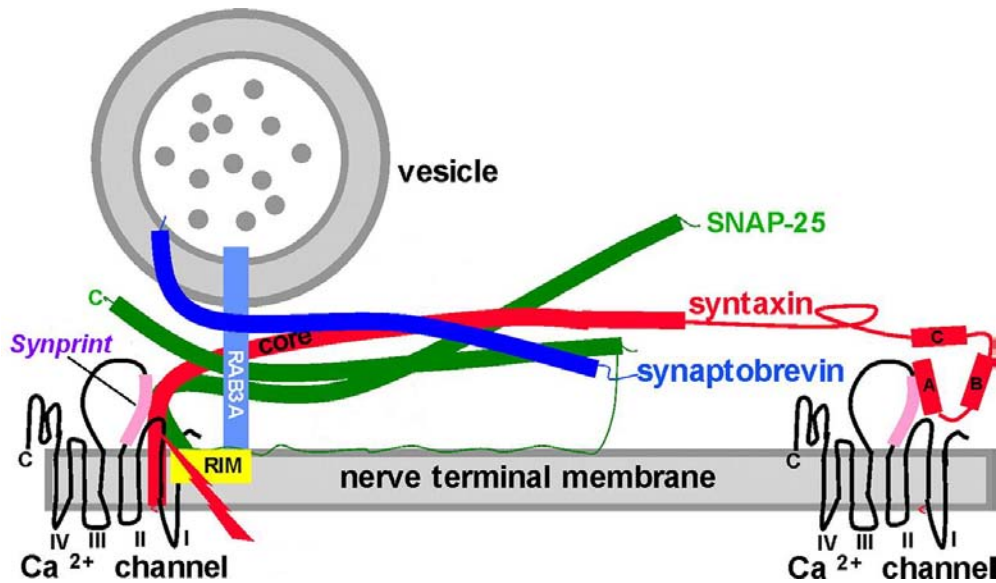


Figura 2.8- Modelo esquemático representando el sitio de interacción con proteínas sinápticas de los CCDV (*Synprint*) en la membrana de una terminación sináptica. Este sitio de interacción está compuesto por una secuencia aminoacídica que se ubica en el bucle intracelular entre los dominios II y III de la subunidad $\alpha 1A$ de unos determinados subtipos de CCDV (representado en color rosa). Con este sitio interactúan proteínas de la maquinaria exocitótica tales como: CSP, sintaxina 1, sinaptotagmina 1, RIM y SNAP-25. Figura tomada de Silinsky (2008).

Actualmente se postula que la función del *synprint* es mantener un acoplamiento físico entre las vesículas exocitóticas y los CCDV, con la finalidad de aumentar la eficiencia del proceso de acoplamiento funcional estímulo-secreción en las terminaciones sinápticas (Figura 2.8). Por ejemplo, la inyección de péptidos aislados que contenían la secuencia del *synprint* en el ganglio cervical simpático (SCGNs) redujo a tan solo el 42% la eficiencia de la transmisión sináptica (Mochida y col., 1996). Por otro lado, la inyección del péptido *synprint* en neuronas de *Xenopus* produjo una reducción del 25% en la transmisión sináptica (Rettig y col., 1997).

Se han postulado otras posibles funciones para el *synprint*: Existen datos que indican que la asociación entre el *synprint* y las proteínas de la maquinaria exocitótica también regularía la actividad de los CCDV (Zhong y col., 1999; Zamponi, 2003). El *synprint* también estaría implicado en otros procesos tales como la localización de los canales de calcio de tipo P/Q en la membrana plasmática (Mochida y col., 2003; Jarvis y Zamponi, 2007) y en la endocitosis (Watanabe y col., 2010).

Existen algunos resultados previos que sugieren que el *synprint* podría tener importancia en el acoplamiento estímulo-secreción en células cromafines. La presencia de diferentes variantes de *splicing* del sitio *synprint* en CCDV de tipo P/Q fue identificada en células cromafines bovinas (Rajapaksha y col., 2008). Además se demostró la co-inmunoprecipitación de la subunidad $\alpha 1A$ de CCDV con el complejo SNARE usando anticuerpos monoclonales contra SNAP-25 en células cromafines bovinas (Andrés-Mateos y col., 2005).

Se observó también que la subunidad $\alpha 1A$ del CCDV del subtipo P/Q y SNAP-25 colocalizan en la membrana intacta de las células cromafines bovinas (Andrés-Mateos y col., 2005). A partir de estos resultados y los nuestros propios que serán discutidos en esta tesis más adelante, podemos plantear como hipótesis de trabajo para un futuro el hecho de que el *synprint* podría mediar el acoplamiento entre las vesículas del IRP y los CCDV de tipo L en células cromafines embrionarias de rata, determinando así la alta eficiencia de liberación de este grupo de vesículas frente al estímulo fisiológico de hipoxia (Fernández-Morales y col., 2013) y el estímulo de alto potasio (Fernández-Morales y col., 2009).

2.3 Canales de K^+ dependientes de voltaje (Kv)

Los canales de K^+ constituyen el grupo más heterogéneo de proteínas estructurales de membrana. En las células excitables, la despolarización celular activa los canales de K^+ dependientes de voltaje (Kv) y facilita la salida de K^+ de la célula, lo que conduce a la repolarización del potencial de membrana. Además, los canales de K^+ juegan un importante papel en el mantenimiento del potencial de reposo celular, la frecuencia de disparo espontáneo de las células excitables, la liberación de neurotransmisores, la secreción de insulina, la excitabilidad celular, el transporte de electrolitos por la células epiteliales, la contracción del músculo liso y la regulación del volumen celular. También existen canales de K^+ cuya activación es independiente de cambios en el potencial de membrana, que regulan actividades como el potencial de reposo, la excitabilidad y el volumen extracelular.

La mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) ha sido clave para permitir conocer la topología y función de los canales Kv. La identificación del primer canal de K^+ fue la consecuencia del primer estudio electrofisiológico del mutante *Shaker* de *D. melanogaster* (Papazian y col., 1987). Desde entonces se han identificado más de 200 genes que codifican diversos canales de K^+ . Atendiendo al mecanismo de activación podemos subdividir los canales de K^+ en dos grandes grupos, según sean activados por cambios de voltaje o por agonistas. Sin embargo, la clasificación más habitual es aquella que agrupa a los canales de K^+ atendiendo a la topología de las subunidades $\alpha 1$, es decir, al número de poros y de segmentos transmembrana del canal (denominados S en los canales Kv y M en los canales activados por ligandos endógenos). Desde este punto de vista, podemos hablar de 3 grandes familias de canales de K^+ (Snyders, 1999; MacKinnon, 1991).

2.3.1 Canales de K^+ que presentan 6 segmentos transmembrana y un poro (6TM-1P)

A este grupo pertenecen los canales de K^+ que se activan por cambios de voltaje (Kv), los canales *ether-a-go-go* (KCNH), los canales de K^+ activados al aumentar la concentración intracelular de Ca^{2+} (KCNM y KCNN) y los KvLQT (KCNQ). Dentro del grupo de canales de Kv incluimos a los miembros de las familias *Shaker* (KCNB), *Shab* (KCNB), *Shaw* (KCNC) y *Shal* (KCND), que en los mamíferos reciben los nombres de Kv1, Kv2, Kv3 y Kv4, respectivamente (Figura 3.1) (Chandy y Gutman, 1993). La conductancia a través de los canales de Kv no es lineal, sino que hay canales que conducen iones K^+ más efectivamente en un sentido que en otro al modificar el potencial de membrana celular (Pongs, 1992).

Existe una rectificación externa de los canales Kv y tiene lugar cuando la despolarización facilita la apertura, por lo que aquéllos tipos de canales Kv que presentan este tipo de rectificación facilitan la repolarización del potencial de acción y disminuyen la excitabilidad celular. Otros canales de K^+ presentan rectificación interna y se cierran al despolarizarse la membrana, por lo que participan en el mantenimiento del potencial de membrana celular.

La subunidad α de estos canales de K^+ es la unidad central del canal, ya que contiene el poro conductor, el filtro de selectividad que permite el paso de K^+ frente a otros cationes, el sensor de voltaje que controla los mecanismos que regulan la cinética de apertura y cierre del canal y los puntos de unión para ligandos endógenos y fármacos. Presenta 6 segmentos que atraviesan la membrana, de los que 5 son hidrofóbicos (S1-S3, S5, S6) y uno (S4) está cargado positivamente (contiene arginina o lisina cada 3 residuos) actuando como sensor de voltaje (Pongs, 1992; Yool y Schwarz, 1991).

Los segmentos S1-S6 de los canales de las distintas subfamilias muestran una homología del 40 % en su secuencia proteica, pero existen importantes variaciones en los extremos C- y N- terminales. Los canales de K^+ de alta conductancia activados por Ca^{2+} (BK_{Ca}) presentan un extremo N-terminal extracelular; 7 segmentos transmembrana (S0-S6) y un extremo C-terminal en el que se localizan 4 segmentos más (S7-S10) intracitoplasmáticos que participan en la regulación del canal por los iones Ca^{2+} (Figura 3.1) (Wallner y cols., 1996).

Los canales Kv disponen en su estructura de dipolos que pueden detectar las posibles variaciones del potencial de membrana e inducir cambios conformacionales en la proteína del canal que conduzcan a su activación o apertura (Van Lamsweerde-Gallez y Meessen, 1978). El sensor de voltaje como dijimos está formado por el segmento S4, que presenta cada 3 residuos un aminoácido (arginina o lisina) cargado positivamente (X-X-A/L) y por las cargas negativas de los segmentos S2 y S3, que ejercen una acción electrostática con el segmento S4 (Papazian y col., 1991,1995). El mecanismo íntimo que controla el acceso de iones permeables al poro es desconocido, si bien parece ser que varios residuos de los segmentos S5-S6 podrían regular dicho acceso de los iones de K^+ al poro del canal (Liu y col., 1997).

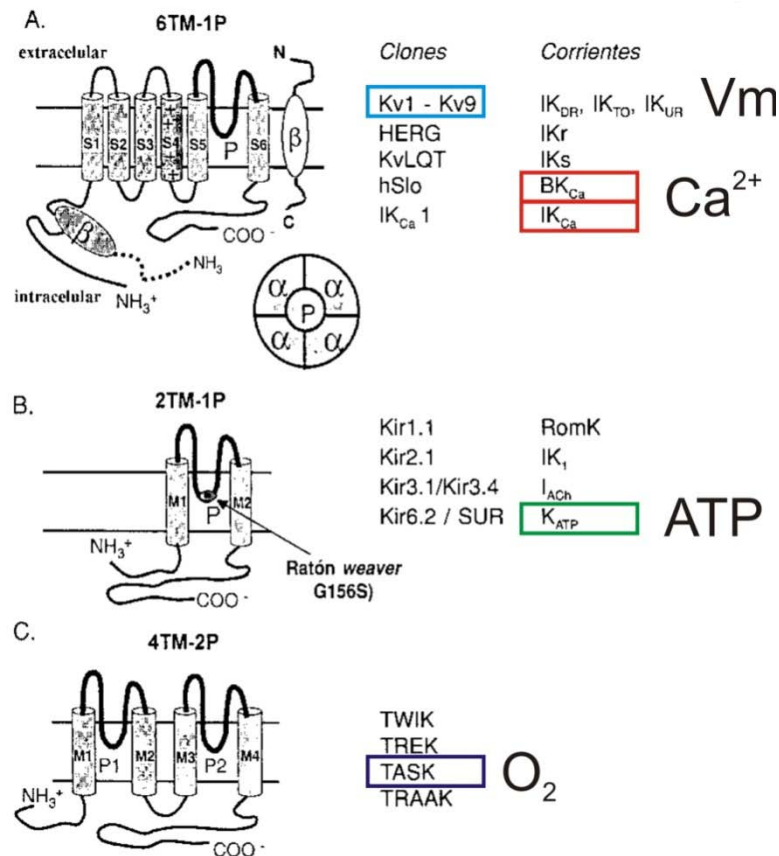


Figura 3.1- Tipos de canales de potasio. Entre rectángulos de diferentes colores se encuentran los distintos subtipos de canales de K⁺ sensibles a diferencias en la concentración de oxígeno (morado), ATP (verde), Ca²⁺ (Rojo) y potencial de membrana (azul). Se destacan dichos subtipos de canales de K⁺ por ser relevantes en la regulación de procesos fisiológicos como es la respuesta al estrés de hipoxia (entre otras muchas funciones), que es parte central del estudio de esta Tesis Doctoral. Figura modificada de Tamargo (2003).

2.4.5 Canales de K⁺ que presentan 2 segmentos transmembrana y un poro (2TM-1P)

Dentro de este grupo existen 7 subfamilias que cuando se expresan en sistemas heterólogos generan corrientes que presentan rectificación interna o *Kir*, es decir, que conducen más iones K⁺ hacia adentro que hacia afuera de la célula, siendo máxima su conductancia a potenciales cercanos al nivel del potencial de equilibrio para el K⁺ (aproximadamente -90 mV), y disminuyendo con la despolarización, por lo que juegan un importante papel en la regulación del potencial de reposo celular evitando una pérdida masiva del K⁺ intracelular. La conductancia al potasio por los *Kir* se favorece cuando hay potenciales de membrana más negativos y se bloquea cuando la célula está más despolarizada.

En condiciones fisiológicas estos canales permiten la salida de K^+ cuando las células están a 20 mV o menos sobre el potencial de reposo (de -65 mV a -45 mV), y no conducen cuando el potencial de membrana se sitúa a más de -40 mV. La rectificación se ha atribuido a la acción de los iones Mg^{2+} y de poliaminas (espermina, espermidina) que ocluyen el vestíbulo interno del poro (Matsuda, 1991; Wible y col., 1995).

A este grupo pertenecen también los canales que se activan por acetilcolina o adenosina (Kir3.1/Kir3.4) (Figura 3.1) y también pertenecen a este grupo los canales de K^+ que se activan cuando disminuye la concentración intracelular de ATP (Figura 3.1) (Kir6.2/SUR), algo que sucede por ejemplo en situaciones de hipoxia en la célula cromafín (Buttigieg y col., 2009; Salman y col., 2012) como en la isquemia cardíaca o cerebral (Gogelein y col., 1999; Liss y Roeper, 2001; Minami y col., 2004). Debido a que la activación de estos canales de potasio sensibles a ATP (K^+_{ATP}) es dependiente de la relación ADP/ATP se constituyen en sensores del estado metabólico de la célula, regulando así la excitabilidad de la membrana. El canal es activado además de por el ATP extracelular, por el óxido nítrico y por la baja disponibilidad de ATP en el citosol. Es inhibido por la vasopresina y por el fármaco sulfonilurea, un fármaco hipoglucemiante oral que facilita la liberación de insulina en las células beta del páncreas. Esto ocurre precisamente como consecuencia del cierre del canal K^+_{ATP} , que permite la despolarización de la membrana y la entrada de calcio por los CCDV.

2.3.3 Canales de K^+ con 4 segmentos transmembrana y dos poros (4TM-2P)

Representan la familia de canales más recientemente identificada (Lesage y Lazdunski, 2000) y la más abundante en el gusano *Caenorhabditis elegans*, donde existen más de 50 miembros (Wang y cols., 1999). Se incluyen las familias TWIK, TASK, TRAAK y TREK (Figura 3.1), que participan en el mantenimiento del potencial de reposo celular y cuya activación puede ser voltaje-independiente en muchas células.

Los canales TWIK presentan rectificación interna similar a los de la familia Kir. Los canales TREK y TASK se modulan por la concentración intracelular de

hidrogeniones (lo que plantea su papel en situaciones de isquemia e inflamación); en concreto a la familia TASK pertenecen los canales de K^+ activados por diferencias en la concentración de oxígeno en el medio (KO_2). Estos canales son activados por anestésicos volátiles (halotano, isoflurano, cloroformo) e inhibidos por anestésicos locales (bupivacaína, meperidina y ropivacaína) (Patel y col., 1999). Los canales TRAAK se modulan por el ácido araquidónico. Una característica de estos canales es que no son bloqueados por TEA o 4-aminopiridina.

2.4 Hipoxia

La hipoxia es un estado de deficiencia de oxígeno en la sangre, células y tejidos del organismo, que compromete la función de éstos. Esta deficiencia de oxígeno puede ser debida a muchas causas, pero una de las más frecuentes en la actividad del ser humano, es la reducción de la presión parcial de oxígeno como consecuencia de la disminución de la presión atmosférica con la altitud.

2.4.1 Tipos de Hipoxia

2.4.1.1 Hipoxia hipóxica

Este tipo de hipoxia se debe a una alteración de las fases de ventilación alveolar y/o a la disfunción alveolocapilar, que produce una deficiente entrega de oxígeno a la sangre de los capilares pulmonares. Las causas de la hipoxia hipóxica son por ejemplo: la exposición a la altitud o las afecciones del pulmón (neumonía, enfisema, etc.).

2.4.1.2 Hipoxia hipémica

La hipoxia hipémica se debe a una alteración de la fase de transporte de oxígeno durante la respiración; consiste fundamentalmente en una reducción de la capacidad de transporte de oxígeno por parte de la sangre. Ciertos compuestos, tales como nitratos o monóxidos de carbono, pueden alterar las características de la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos o bien, combinarse directamente con ella, reduciendo su capacidad de transporte del oxígeno. El monóxido de carbono por ejemplo se encuentra también en

el humo del cigarrillo. La hemoglobina posee una afinidad por el monóxido de carbono 250 veces mayor que por el oxígeno, por lo que no es fácil eliminar este elemento de la circulación sanguínea. Las causas más frecuentes de hipoxia hipémica son: la intoxicación por monóxido de carbono, una pérdida de sangre (hemorragia, donación de sangre) o el tabaquismo.

2.4.1.3 Hipoxia por estancamiento

Este tipo de hipoxia se debe también a una alteración de la fase de transporte de oxígeno por la sangre. Sucede una reducción del flujo de sangre a un sector del organismo determinado o a su totalidad. Esta condición puede deberse a un fracaso de la capacidad cardíaca, a condiciones ambientales o a condiciones de aceleración extrema (por ejemplo experimentación de fuerzas G en pilotos de aviones de combate o acrobacia; en estos aviones las fuerzas G están orientadas hacia los pies, haciendo que llegue menos sangre al cerebro). Las causas más frecuentes de hipoxia por estancamiento son: la insuficiencia cardíaca, cualquiera de los tipos de shock o la respiración a presión positiva continuada.

2.4.1.4 Hipoxia histotóxica

Este tipo de hipoxia se debe a una alteración en la utilización del oxígeno durante la respiración y consiste en la incapacidad de las células para consumir el oxígeno de forma adecuada. Se produce por la acción de ciertas sustancias sobre el metabolismo celular. Las causas más frecuentes de hipoxia histotóxica son: la intoxicación por cianatos (que se desprenden en la combustión de ciertos plásticos) o la intoxicación por alcohol.

2.4.2 El cuerpo carotídeo y la hipoxia

El cuerpo carotídeo es una pequeña glándula de secreción interna altamente irrigada e inervada, de color gris-rojizo y de 4 a 5 mm de diámetro en los humanos; se llama también “*glomus carotídeo*” o “*corpúsculo retrocarotídeo*”. Se localiza posteriormente al ángulo de bifurcación de la arteria carótida común que forman las

arterias carótidas externa e interna (Figura 4.1A, E). Es un quimiorreceptor que controla la concentración de oxígeno en la sangre. Las bajas concentraciones de oxígeno en sangre lo estimulan e inician un reflejo que incrementa la frecuencia y la profundidad de la respiración, la frecuencia cardíaca y la tensión arterial.

Desde el punto de vista histológico está compuesto por células glomerulares de tipo I, células de vaina de tipo II y por tejido conectivo, nervios y capilares (Figura 4.1B). Las células glomerulares están empaquetadas densamente alrededor de los vasos sanguíneos; son células cromafines pertenecientes al grupo APUD (del inglés: Amino Precursors Uptake and Descarboxilation) o sistema neuroendocrino, con vesículas densas que contienen dopamina, noradrenalina, serotonina, acetilcolina y encefalinas. Las células de vaina de tipo II son fagocíticas; tienen prolongaciones citoplasmáticas largas que envuelven a grupos de células glomerulares. El cuerpo carotídeo recibe ramas del nervio sinusal o nervio de Hering, perteneciente al nervio glossofaríngeo (Figura 4.1A, B).

La supervivencia de los mamíferos en estados de hipoxia aguda requiere ajustes respiratorios y cardiocirculatorios rápidos para asegurar el suficiente suministro de sangre oxigenada a sus tejidos y particularmente a las células cerebrales, las cuales son altamente vulnerables a la falta de oxígeno. El cuerpo carotídeo ha sido reconocido durante décadas como un órgano sensor capaz de transducir reducciones de la presión parcial de oxígeno (pO_2) arterial en señales nerviosas aferentes transportando la información hacia los centros respiratorios del tronco encefálico para evocar la hiperventilación (Figura 4.1F). Sin embargo, los mecanismos moleculares y celulares subyacentes a esta quimiotransducción de señales se han mantenido no muy bien conocidos hasta la actualidad. Entre los diferentes tipos celulares en el cuerpo carotídeo, las células glomerulares han sido consideradas como los elementos clave en el proceso de detectar las variaciones de pO_2 , ya que su integridad es esencial para la normal sensibilidad a hipoxia del órgano (Verna y col., 1975); estas células contienen numerosas vesículas citosólicas ricas en catecolaminas y otros posibles neurotransmisores, y establecen sinapsis bien definidas con las terminaciones nerviosas aferentes (Figura 4.1B) (McDonald y Mitchell, 1981; Rigual y col., 1986).

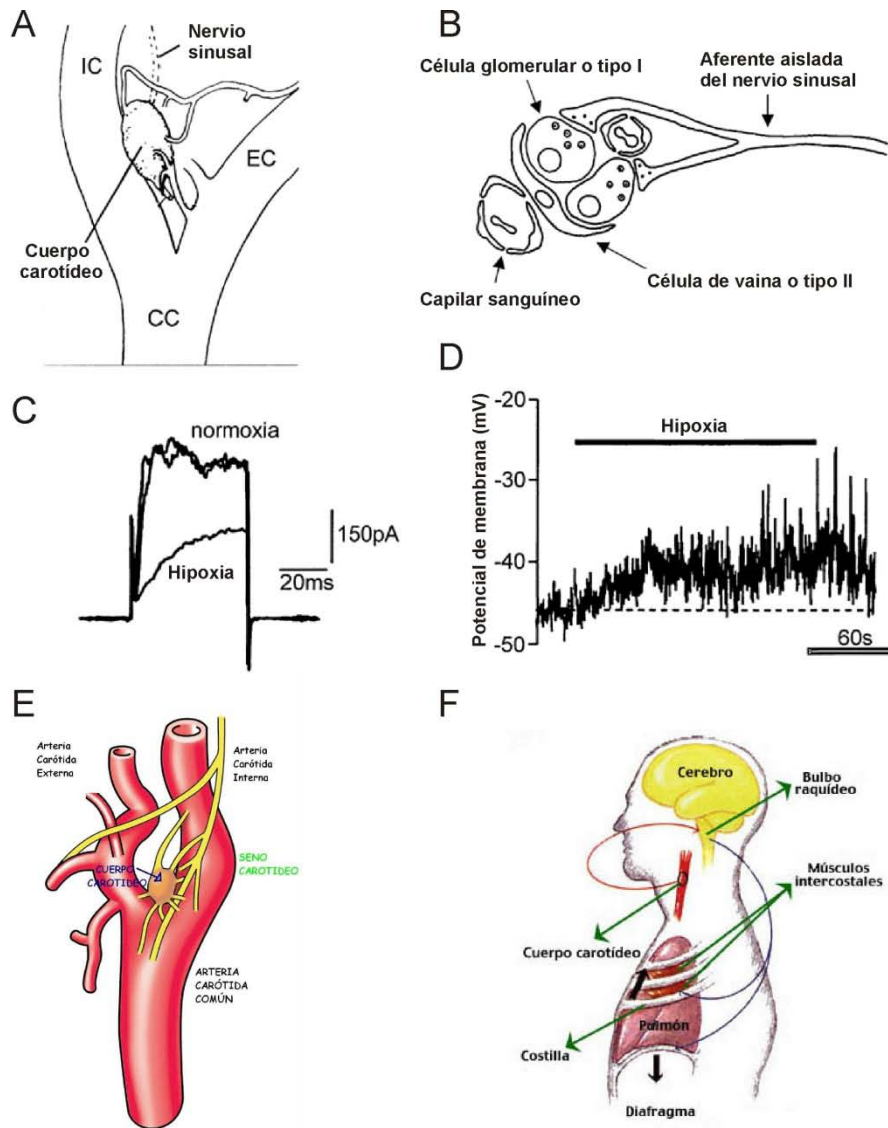


Figure 4.1- Estructura, localización y función del cuerpo carotídeo. (A) Esquema del cuerpo carotídeo, el cual se encuentra localizado entre la bifurcación de la arteria carótida común (CC) en dos ramas: la arteria carótida externa (EC) y la arteria carótida interna (IC). (B) Dibujo de una agrupación de células del cuerpo carotídeo. Las terminaciones quimiosensoras aferentes del nervio sinusal están en contacto sináptico con las células glomerulares o de tipo I que contienen neurotransmisores. Las agrupaciones de células glomerulares son encapsuladas por células de vaina o de tipo II y el órgano recibe un rico aporte de sangre arterial por medio de una extensa red de capilares sanguíneos. (C) Se representan registros de corrientes de salida de K^+ registradas en células glomerulares de tipo I usando la técnica de patch clamp en la configuración de fijación de voltaje. Las corrientes fueron evocadas por medio de pulsos despolarizantes cuadrados desde el potencial de fijación (-70 mV) hasta $+20$ mV. Obsérvese la inhibición reversible de la corriente de K^+ por hipoxia. (D) Registro del potencial de membrana en otra célula glomerular o de tipo I usando la técnica de patch-clamp bajo la configuración de fijación de corriente. La hipoxia causa una despolarización de membrana; este efecto es modesto pero es suficiente para activar los CCDV presentes en estas células. (E) Localización del cuerpo carotídeo. (F) Circuito neuronal mediador de la respuesta a hipoxia. Las terminaciones nerviosas aferentes que conforman el nervio sinusal (flecha roja) transportan la información desde el cuerpo carotídeo hacia los centros respiratorios del tronco encefálico (bulbo raquídeo), en estas neuronas se integra una respuesta que parte por nervios eferentes (flechas moradas) hacia el corazón y los pulmones cuya finalidad será evocar la hiperventilación. Figura tomada y modificada de (Wyatt y col.,1995).

cultivos primarios de células que han sido disgregadas enzimáticamente. Estos experimentos han mostrado que las células glomerulares, las cuales al igual que las células cromafines son de origen neuroectodérmico, pueden generar potenciales de acción dependientes de Na^+ y de Ca^{2+} repetitivamente y sus especiales propiedades quimiorreceptoras están basadas en la presencia de canales de K^+ sensibles a O_2 cuya probabilidad de apertura se ve disminuida por la presencia de bajas pO_2 (Hipoxia) (Figura 4.1C; 4.2) (López-Barneo y col., 1988; Delpiano y Hescheler, 1989; Stea y Nurse, 1991; Ganfornina y López-Barneo, 1991, 1992). Curiosamente, se ha sugerido recientemente que las neuronas del tronco encefálico pueden también percibir las reducciones de la pO_2 arterial a través de la liberación de moléculas derivadas del óxido nítrico (NO^-) (Lipton y col., 2001; Berger y col., 2002).

Se ha descrito recientemente un tipo de canal de K^+ dependiente de voltaje que participa en la detección de las pO_2 en las células, particularmente en las células glomerulares del cuerpo carotídeo. Estos canales se han denominado canales de K^+ de homología a TASK (TASK-like K^+ channels). Lo primero que se observó es que la hipoxia inhibe canales de K^+ de tipo TASK-1 y 3 (del inglés, acid sensitive tandem-P-domain K^+ channels). Estos canales son muy sensibles a la inhibición del metabolismo energético mitocondrial, y la acidosis también participa de la respuesta. A nivel pulmonar, el grupo de Stephen Archer de Edmonton (Canada) ha identificado el rol de los canales de K^+ dependiente de voltaje Kv 1.5 y Kv 2.1 en el mecanismo de vasoconstricción pulmonar hipóxica.

Como en el cuerpo carotídeo, también la hipoxia inhibe canales Kv en la célula muscular lisa de arterias, concretamente en los vasos de resistencia, provocando la despolarización, la apertura de CCDV y la consiguiente contracción del musculo liso. Hay nueve familias de canales Kv como vimos anteriormente (Figura 3.1), pero los candidatos frente al estímulo hipóxico parecen ser Kv 1.5 y Kv 2.1 (este último es el más importante en mantener el potencial de reposo en estas células). Estos canales están sujetos a una rápida regulación redox por especies reactivas de oxígeno (ROS) provenientes de los hoy considerados *sensores de oxígeno*, tales como la *mitocondria* y la *enzima NADPH oxidasa*. Una posible vía sería producción de ROS mitocondriales →

Activación del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1 α) → Inhibición de Kv 1.5 / Kv 2.1.

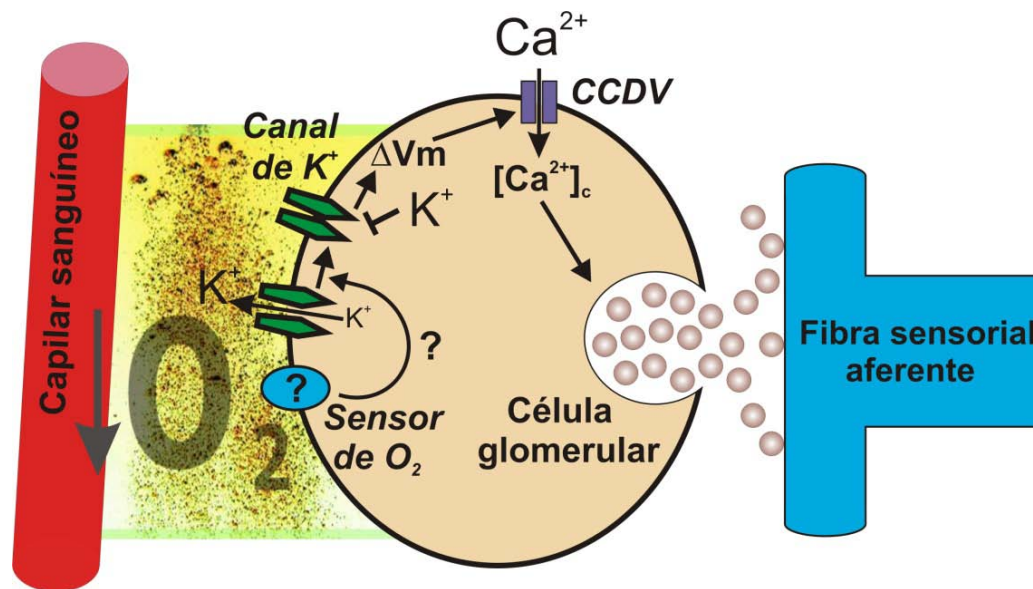


Figura 4.2- Detección del oxígeno por las células glomerulares del cuerpo carotídeo. Estas células son parecidas a elementos presinápticos, se encuentran en la proximidad de capilares sanguíneos formando sinápsis con fibras sensoriales aferentes del nervio sinusal. Cuando se reduce la pO_2 en la sangre (hipoxia) hay un bloqueo de canales de K^+ sensibles a O_2 y la subsiguiente despolarización celular (ΔV_m). El incremento del potencial de membrana produce la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV), la elevación del Ca^{2+} citosólico ($[Ca^{2+}]_c$), que dispara la liberación de neurotransmisores. Aún se desconoce la naturaleza del sensor de O_2 por medio del cual los cambios en la pO_2 regulan la actividad de los canales de K^+ , aunque algunos estudios apuntan a que podrían ser la mitocondria y la enzima NADPH oxidasa (símbolo de interrogación). Elaboración propia, inspirado de López-Barneo, (2003).

Se ha demostrado que la hipoxia incrementa la excitabilidad eléctrica en las células glomerulares del cuerpo carotídeo (Figura 4.1D) (López-López y col., 1989) y la liberación de dopamina (Fishman y col., 1985) en cultivos de células glomerulares (Figura 4.2); se ha propuesto que estas células pueden funcionar de forma semejante a elementos presinápticos sensibles a O_2 capaces de transducir una reducción en la PO_2 en una respuesta secretora dependiente de Ca^{2+} externo (Figura 4.2) (González y col., 1992; López-Barneo, 1993).

Este esquema de quimiotransducción ha sido apoyado por los trabajos de varios laboratorios donde observan que se produce un incremento de las concentraciones de calcio citosólico ($[Ca^{2+}]_c$) en respuesta a bajas PO_2 (hipoxia) dependiente de la entrada de Ca^{2+} a través de CCDV (Sato y col., 1991; Ureña y col., 1994) (Figura 4.2). El acoplamiento directo entre la entrada de Ca^{2+} y la secreción cuantica de dopamina en células glomerulares aisladas fue demostrado por vez primera por Ureña y col., (1994).

La inhibición de la actividad de los canales de K^+ sensibles a O_2 (KO_2) en células glomerulares disgregadas (Figura 4.1C) se produce cuando la pO_2 disminuye por debajo de 150 mm Hg (valores control) hasta valores de 80 mm Hg donde alcanza ya un efecto máximo (López-López y col., 1989; Ganfornina y López-Barneo, 1991); mientras que el incremento de la tasa de descarga registrada *in vivo* de las fibras nerviosas aferentes que parten del cuerpo carotídeo intacto se observa solo cuando los valores de la PO_2 disminuyen por debajo de 70 mm Hg (Biscoe y col., 1970); posteriormente sin embargo se demostró que la relación entre la PO_2 y la secreción de neurotransmisores a nivel de célula aislada es comparable con lo que sucede en el cuerpo carotídeo intacto (Montoro y col., 1996) por lo que las propiedades de las células glomerulosas aisladas explicaría la función quimiorreceptora del órgano completo.

Este modelo de detección del O_2 opera en otros tipos celulares que agudamente responden a hipoxia (López-Barneo y col., 2001), aunque el tipo de canal de K^+ modulado por la pO_2 varía en las diferentes preparaciones: células quimiorreceptoras de arteria de rata (Buckler y col., 2000), células MAH (línea celular proveniente de un progenitor simpatoadrenal inmortalizado) derivadas de células cromafines inmortalizadas de rata (Fearon y col., 2002), células glomerulares del cuerpo carotídeo del conejo (Sánchez y col., 2002).

Como ya hemos comentado anteriormente, la identidad del sensor de O_2 en las células glomerulares del cuerpo carotídeo y la vía de señalización que acopla al sensor de O_2 con los diferentes efectores continúa siendo no muy bien conocida (Figura 4.2). El papel del cuerpo carotídeo como un sensor metabólico integrado ha sido recientemente puesto de manifiesto tras el descubrimiento de que las células glomerulares pueden detectar bajas concentraciones de glucosa y por tanto participan

activamente en la respuesta reguladora para contrarrestar la hipoglucemia (Pardal y López-Barneo, 2002).

2.4.3 La célula cromafin y la hipoxia

La secreción de catecolaminas de las células cromafines de la médula adrenal juega un papel clave en la respuesta protectora a diversos tipos de estrés fisiológico originados por hipoglucemia, hemorragias e hipoxia entre otros. En las células cromafines de médula adrenal de animales adultos esta secreción es controlada por las fibras colinérgicas del nervio esplácnico.

La médula adrenal juega un papel crucial y de mayor relevancia en la adaptación al estrés en los fetos y neonatos de mamíferos que en los individuos adultos (Slotkin y Seidler, 1988). De hecho en los humanos recién nacidos hay una gran liberación de catecolaminas de la médula adrenal en el momento del parto (Lagercrantz y Bistoletti, 1977; Lagercrantz y Slotkin, 1986); estas catecolaminas son de vital importancia para que el neonato adapte su sistema respiratorio, cardiovascular y sus funciones metabólicas a las nuevas condiciones que demanda la vida extrauterina (Jones y col., 1979). Por ejemplo, en el momento del nacimiento el feto está expuesto a un estrés agudo de hipoxia, y este estrés desencadena una secreción de catecolaminas que van a ser las responsables de que el feto sea capaz de iniciar la respiración de aire al inducir que las células del epitelio pulmonar cambien de un modo neto de secreción de fluidos a un modo neto de absorción (Olver & Walters, 1977; Olver y col., 2004). Por lo tanto, no resulta sorprendente que una reducción en la liberación de catecolaminas en el momento del parto se asocie con un descenso de la capacidad de supervivencia del neonato (Lagercrantz y Bistoletti, 1977; Lagercrantz y Slotkin, 1986; Seidler y Slotkin, 1985).

En muchas especies (rata, ternero, oveja), incluido el humano, la inervación simpática de la médula adrenal está ausente o no es funcional en el momento del nacimiento (Comline y Silver, 1966a,b; Gootman y col., 1978,1979; Pappano, 1977). Sin embargo, el neonato depende exclusivamente de la liberación de catecolaminas de la médula adrenal para lograr dar una respuesta adrenérgica al estrés.

En la rata por ejemplo, el control por el nervio esplácnico de la liberación de catecolaminas de la médula adrenal está ausente durante la vida fetal y en los primeros días de vida tras el nacimiento (se instaura a partir de la primera semana aproximadamente). Por lo tanto, el control de la secreción en las células cromafines fetales y neonatales, las cuales carecen de un control nervioso, es únicamente el resultado de un mecanismo no neurogénico (Seidler y Slotkin, 1985). Como hemos comentado anteriormente la respuesta no neurogénica a la hipoxia ha sido bien estudiada en las células de tipo I del cuerpo carotídeo, que al igual que las células cromafines, son también células derivadas del neuroectodermo o cresta neural.

En el caso de las células glomerulares de tipo I del cuerpo carotídeo, la baja pO_2 arterial modula el cierre de los canales de K^+ . La reducción en la conductancia del K^+ por las bajas pO_2 dispara la despolarización de la membrana celular lo que evoca una entrada de Ca^{2+} por CCDV y la secreción de neurotransmisor. En este caso como hemos comentado, la naturaleza del detector del oxígeno y los mecanismos moleculares acoplados al mismo se han adaptado a dos hipótesis: la hipótesis redox y la hipótesis mitocondrial. En ambos casos, los canales de K^+ activados por Ca^{2+} , de tipo BK (que poseen una gran conductancia al ion K^+) aparecen como una diana importante en el proceso de detección del oxígeno (López-Barneo, 2003; Williams y col., 2004). Sin embargo, el mecanismo de la respuesta no neurogénica en células cromafines embrionarias de médula adrenal no está tan claramente identificado. En algunos trabajos se ha propuesto que la hipoxia inhibe corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+} o corrientes de K^+ dependientes de voltaje, aunque hay discusión en la contribución real de cada una de ellas.

En células cromafines de médula adrenal de ovejas neonatas, tanto los canales de K^+ BK como los SK (canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de baja conductancia) están involucrados en la despolarización inducida por hipoxia (Keating y col., 2001, 2009); sin embargo en cobaya se ha sugerido que la inhibición una bomba de Na^+ dependiente de ATP participa en el proceso de despolarización de las células cromafines por hipoxia (Inoue y col., 1999). Por otra parte, en células cromafines de médula adrenal de ratas juveniles los canales de K^+ SK juegan un papel esencial en la despolarización inducida por hipoxia (Lee y col., 2000); sorprendentemente en otro estudio realizado en células

cromafines de rata adulta se observa que los canales K_{ATP} juegan un papel crucial en la respuesta inducida por hipoxia (Mochizuki-Oda y col., 1997).

En células cromafines de médula adrenal de rata embrionaria el mecanismo celular de sensibilidad a hipoxia todavía no ha sido analizado en detalle. Hay datos que afirman que la respuesta a hipoxia en la célula cromafín de rata es dependiente del tiempo, ya que acontece desde la etapa embrionaria hasta aproximadamente una semana después del nacimiento; concretamente en células cromafines embrionarias de rata de 15 y 19 días de gestación la respuesta a hipoxia de la célula cromafín es controlada por la actividad de canales de K_{ATP} y por canales de K_{Ca} con distinto grado de contribución dependiendo de la edad del embrión.

En embriones de rata menos desarrollados, de 15 días de desarrollo, son los canales K_{ATP} los que toman más protagonismo en la modulación de la respuesta a hipoxia mientras que en embriones de rata de 19 días de gestación (de edad similar a los utilizados durante todo el desarrollo del trabajo experimental de esta tesis) serían los canales K_{Ca} los que modularían mayoritariamente la respuesta hipóxica (Bournaud y col., 2007). En otro exhaustivo trabajo realizado por el grupo de Thompson y Nurse (1998) en células cromafines de rata neonata se observó que la anoxia modula diferencialmente las múltiples corrientes de K^+ ; en estas células la anoxia suprime la corriente de K_{Ca} de tipo BK, inhibe también la corriente K_v (que es independiente de Ca^{2+}) y por otra parte la anoxia activa la K_{ATP} .

Algunos estudios muestran que tras extirpar las glándulas adrenales de ratas neonatas y estimularlas con soluciones despolarizantes de alto potasio o mediante nicotina (que es un agonista de los nAChR) estas glándulas adrenales evocan una gran liberación de catecolaminas dependiente de Ca^{2+} . Esto indica que las células cromafines neonatas ya contienen toda la maquinaria necesaria para la liberación exocitótica del contenido de las vesículas cromafines (Rosenthal y Slotkin, 1977; Slotkin, 1973a,b). Las respuestas evocadas por K^+ (como las anteriores referidas) requieren de la entrada de Ca^{2+} a través de CCDV, como fue descrito por vez primera por Douglas and Rubin (Douglas y Rubin, 1963).

Son muy pocos los laboratorios que han estudiado la liberación de catecolaminas utilizando glándulas adrenales de rata fetal o neonata; así cabe citar los estudios de algunos grupos que han trabajado con rodajas de médula adrenal o cultivos de células cromafines aisladas estimuladas con alto potasio, hipoxia, hipercapnia o acidosis (Bournaud y col., 2001,2007; Munoz-cabello y col., 2005; Rico y col., 2005; Thompson y col., 1997; 2002). Bounard y col., (2001) encontraron que el 50 % de las CCRE expresan exclusivamente CCDV de bajo umbral de activación o tipo T, mientras que el otro 50 % tienen ambos tipos de canales, CCDV de alto umbral de activación y de bajo umbral, pero solo los CCDV de alto umbral son capaces de promover la exocitosis.

Como ya hemos reseñado anteriormente la inervación esplácnica de las células cromafines embrionarias de la médula adrenal no se ha desarrollado en muchas especies de mamíferos y por lo tanto no existe un control neurogénico de la liberación masiva de catecolaminas; de ahí que este control deba ser ejercido por un mecanismo no neurogénico (Lagercrantz y Bistoletti, 1977; Seidler y Slotkin, 1985), en el que participarían varios dispositivos celulares. Las bajas pO_2 que acontecen frente al estímulo fisiológico de hipoxia estarían inhibiendo diferentes tipos de canales de K^+ (como hemos explicado más arriba), lo que despolariza la célula cromafín embrionaria produciendo una entrada de Ca^{2+} a través de CCDV y activando la exocitosis (Bournaud y col., 2001; 2007; Keating y col., 2001, 2009; Seidler y Slotkin, 1985). La mitocondria y el NADPH se ha visto que también participan en el control de la respuesta secretora frente a hipoxia (Mojet y col., 1997; Thompson y col., 2007).

Pero, ¿Qué subtipos de CCDV participan en la respuesta secretora promovida por el estímulo hipóxico en CCER? Cabe destacar que solo se han realizado unos pocos estudios que caracterizan los distintos subtipos de CCDV que contribuyen a la secreción de catecolaminas inducida por hipoxia durante la vida fetal y neonatal. Por ejemplo Thompson y col., (1997) mostraron que el nimodipino bloquea la respuesta secretora a hipoxia en poblaciones de células cromafines de rata neonata; y más recientemente, Levitsky y López-Barneo, (2009) han desmostrado que el Ni^{2+} y la pimozida abole la respuesta secretora a hipoxia en rodajas de medula adrenal de rata neonata, poniendo de manifiesto la participación de los CCDV de bajo umbral de activación o tipo T.

Durante el desarrollo del embrión existen diferencias en las vías por las cuales la hipoxia aguda estimula la secreción de catecolaminas de la médula adrenal. Una vez que la médula adrenal es innervada (alrededor de los primeros 8 a 10 días de vida en la rata), acontece un mecanismo reflejo originado en el cuerpo carotídeo, de forma que una disminución en la pO_2 en la sangre estimula la liberación de ACh del nervio esplácnico, el cual pasa a innervar la glándula adrenal (Seidler y Slotkin, 1986). Por lo tanto el mecanismo no neurogénico por el cual la hipoxia promueve la secreción de catecolaminas se ve suprimido tras la innervación de la glándula adrenal (Cheung, 1990). Las bases celulares que promueven esta supresión no están claramente entendidas, pero una sugerencia puede ser que sucedan diferentes patrones de expresión de CCDV antes y después de que la innervación esplácnica de la médula adrenal acontezca, esta expresión diferencial de CCDV puede permitir una retroalimentación positiva de los canales de K_{Ca} que evitaría que la despolarización promovida por hipoxia alcance el umbral necesario.

Las células cromafines contienen dos clases de canales de K_{Ca} : Canales SK, de pequeña conductancia y activados por fuertes cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) y canales BK que poseen una gran conductancia al ion K^+ y que son activados tanto por leves despolarizaciones del potencial de membrana como por moderados incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$. Dada la importancia de los canales K_{Ca} en varias funciones celulares, incluido el control del potencial de membrana de reposo en células cromafines (Keating y col., 2001), la interacción entre los CCDV y los K_{Ca} pueden explicar parcialmente los cambios ocurridos durante el desarrollo en la médula adrenal, incluyendo la pérdida de la respuesta a hipoxia.

Resumiendo lo que hemos presentado anteriormente en esta introducción sobre los distintos subtipos de CCDV diríamos que se han identificado seis clases principales de CCDV: tipos L, N, P, Q, R y T; y estos pueden distinguirse por su voltaje de activación, velocidad de inactivación y por el bloqueo de agentes farmacológicos (Fisher y Bourque, 2001). Los cambios durante el desarrollo en las características de los CCDV se han documentado en neuronas. Los CCDV de tipo N y de tipo L están sometidos a un cambio dinámico, se producen una serie de reordenamientos regulados por el desarrollo en cuanto a la distribución regional y la función durante la diferenciación de las neuronas del hipocampo (Pravettoni y col., 2000).

En las células ganglionares de la retina de rata la densidad de los CCDV se incrementa al pasar de la etapa embrionaria a la adulta, ocurriendo de forma paralela un cambio en la activación de CCDV de tipo N que se activan a potenciales de membrana ligeramente más hiperpolarizados (Schmid y Guenther, 1999). Si estos cambios en los CCDV durante el desarrollo se producen en las células cromafines de la médula adrenal se desconoce actualmente. La entrada de Ca^{2+} en respuesta a hipoxia no se altera entre las rodajas adrenales de rata tomadas antes y después de que la inervación esplácnica se haya desarrollado, pero esta entrada de Ca^{2+} sí que se incrementa con el desarrollo del embrión en respuesta a soluciones de alto K^+ o nicotina (Takeuchi y col., 2001), indicando que la inervación de la glándula adrenal puede alterar las poblaciones de CCDV.

En las glándulas adrenales de embriones de oveja perfundidas “*in vitro*”, el CCDV de tipo L es el único responsable de la entrada de Ca^{2+} que dispara la secreción evocada por hipoxia (Adams et al., 1996). No se conoce en esta célula cromafín embrionaria de oveja si la entrada de Ca^{2+} a través de otros subtipos de CCDV afecta a otras vías de regulación de la secreción y a la excitabilidad celular, así como si afecta a la activación de K_{Ca} (Keating y col., 2009). Durante el desarrollo de la célula cromafín embrionaria de oveja hacia célula cromafín adulta la densidad de corriente de K^+ se incrementa, pero no la corriente de Ca^{2+} . No hay cambios significativos durante el desarrollo en la contribución de los distintos subtipos de CCDV (L, N, P/Q) a la activación de la corriente K_{Ca} ; sin embargo a potenciales hiperpolarizados, la densidad de corriente de Ca^{2+} total es mayor en células fetales que en células adultas (Keating y col., 2009).

En un estudio realizado en células PC12 (son células derivadas de un feocromocitoma de rata) se observó que la hipoxia inhibía corrientes de potasio, se producía la despolarización de la membrana celular y un incremento en el calcio citosólico mayoritariamente debido a la entrada de calcio por el CCDV de tipo L, ya que era casi totalmente inhibido por el bloqueante de CCDV de tipo L nifedipino (Zhu y col., 1996). En un trabajo sugerente realizado en miocitos ventriculares humanos se afirma que el CCDV de tipo L presenta un motivo estructural muy semejante a los dominios de unión a calcio de la proteína calmodulina; concretamente este motivo se

localiza en la cola C-terminal del CCDV. Estos autores observan que esta cola C-terminal del CCDV de tipo L cardíaco esta directamente involucrada en la detección de los niveles de oxígeno por parte del miocito durante los primeros segundos en los que se le priva de oxígeno (Movafagh y Morad, 2010).

En uno de los trabajos objeto de esta tesis hemos observado que el bloqueo del CCDV de tipo L por nimodipino o nifedipino suprime casi totalmente la respuesta secretora inducida por hipoxia en célula cromafin embrionaria de rata (Fernández-Morales y col., 2013), el Ni^{2+} , mibefradilo y NNC 55-0396, reputados como agentes farmacológicos selectivos para bloquear los CCDV de tipo T también causan un bloqueo sustancial de la respuesta secretora inducida por hipoxia en estas células cromafines; por el contrario, utilizando bloqueantes selectivos de los CCDV de tipo no L (CCDV de tipo N y P/Q) solo observamos un débil bloqueo sobre la respuesta secretora inducida por hipoxia.

Nuestros resultados sugieren que la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV de tipo L es el principal factor determinante en la respuesta secretora inducida por hipoxia en la CCER; la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV de tipo T contribuiría de forma parcial a la génesis de la respuesta secretora promovida por la hipoxia. La leve despolarización que induce el bloqueo de las corriente de K^{+} en respuesta a hipoxia facilitaría la apertura inicial de los CCDV de tipo T, que se activan con un bajo umbral de voltaje cercano al potencial de membrana en reposo; la entrada de calcio por estos canales T facilitaría la apertura del resto de CCDV de alto umbral, entre ellos el CCDV del subtipo L, que es capaz de acarrear un mayor volumen de corriente de Ca^{2+} debido a su mayor conductancia y más lenta inactivación.

La entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV de tipo L puede cooperar además con los K_{Ca} en el mantenimiento del potencial de reposo en estas células cromafines inmaduras (Figura 4.4). En nuestro trabajo hemos encontrado que la despolarización de membrana inducida por hipoxia en las CCER se encuentra también mayoritariamente controlada por el CCDV de tipo L (α_{1D} , Cav1.3). Estos datos revelan nuevos aspectos en los factores que regulan la respuesta secretora inducida por hipoxia en CCER. Todos estos datos en su conjunto, como expondremos a continuación, pueden tener una importancia terapéutica y fisiopatológica para prevenir el daño cerebral inducido por el

estrés hipóxico durante la vida fetal, en el momento del nacimiento y durante los primeros días de vida del neonato.

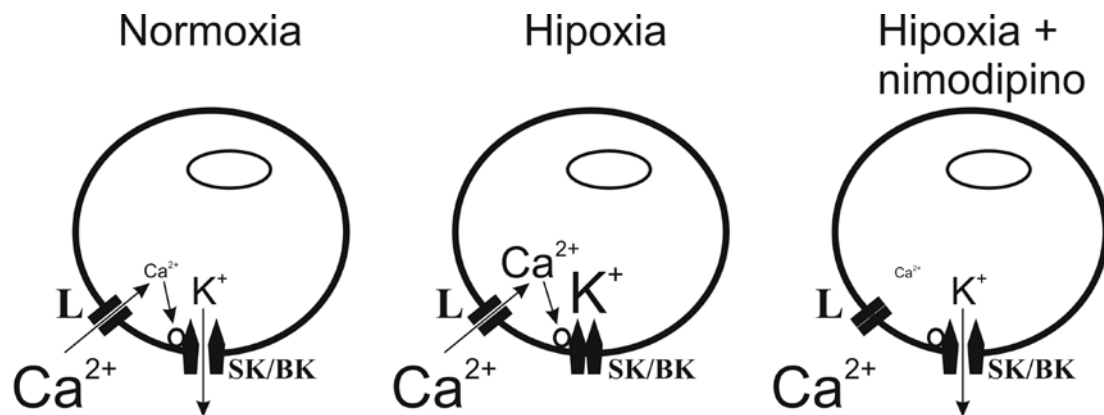


Figura 4.4- Esquema ilustrativo de cómo el CCDV de tipo L puede cooperar con los canales de K^+ sensibles a calcio (K_{Ca}) en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo tras la despolarización de membrana inducida por hipoxia en la célula cromafín embrionaria de rata.

2.4.4 El Síndrome de muerte súbita infantil y la hipoxia

La causa del síndrome de muerte súbita infantil (SMSI) aún no es bien conocida, y esta característica ha sido incorporada a su propia definición. El SMSI ha sido definido como “el síndrome inesperado por el cual se produce la muerte de un infante de menos de un año de edad, con el comienzo de un episodio fatal ocurrido aparentemente durante el sueño, que permanece inexplicada después de una completa investigación, que incluye la ejecución de una autopsia completa, la revisión de todas las circunstancias de la muerte y el estudio de la historia clínica” (Krous y col., 2004).

Para explicarlo se han propuesto un gran número de mecanismos: La obstrucción de las vías aéreas (Tonkin, 1975); la reinhalación de los gases expirados (Kemp y col., 1993); el estrés térmico (Nelson y col., 1989); las infecciones (Blackwell y col., 1993,1999); la apnea (Steinschneider, 1972); la arritmia cardíaca (Schwartz, 1976); la intoxicación por vacunas (Scheibner, 2003) y los gases tóxicos (Richardson, 1990, 1994). Es difícil encontrar evidencias que apoyen a uno de estos factores de riesgo como el principal en la aparición del SMSI.

La apnea es el cese completo de la señal respiratoria (medida por termistor, cánula nasal o neumotacógrafo) durante el menos 10 segundos de duración; si este cese se produce durante un periodo prolongado de tiempo y de forma frecuente puede conducir a procesos de hipoxia aguda. Durante el periodo de descanso la respiración depende de los músculos que controlan la mandíbula, la lengua y el paladar y que mantienen abierta la vía respiratoria; cuando estos músculos se relajan, la mandíbula cae y la lengua retrocede, estrechando u obstruyendo la vía aérea y produciendo las dificultades respiratorias, que van desde los ronquidos hasta las apneas; en estos momentos, el cerebro se ve obligado a realizar lo que se denomina “*microdespertares*”, instantes en los que el sueño se interrumpe para que el cuerpo pueda recuperar el ritmo respiratorio; estas interrupciones impiden que el organismo descanse completamente, lo que provoca la aparición de un gran número de dolencias, como dolores de cabeza o cefaleas matutinas, hipertensión pulmonar al exigírsele un esfuerzo añadido a este órgano, hipertensión y problemas cardíacos como arritmias o cardiopatías isquémicas, temblores o espasmos musculares entre otras.

La hipótesis de la apnea fue la teoría dominante para explicar el SMSI durante las décadas de los años 1970 y 1980; estos trabajos se realizaron siguiendo los informes de estudios del sueño durante el descanso en niños que presentaban apneas frecuentes y episodios cianóticos (piel azulada) (Steinschneider, 1972). Dos de los niños estudiados que presentaban apnea murieron poco después y a la causa de su muerte se le asignó el SMSI. Lo interesante de estos casos clínicos es que los hermanos mayores de estos niños también habían muerto en circunstancias similares. Sin embargo por los registros cardiorrespiratorios era imposible distinguir quienes de los niños tenían un riesgo elevado de padecer el SMSI de aquellos que no (Kelly y col., 1986). Los programas de monitorización de la apnea han resultado no ser efectivos para salvar vidas de niños y a pesar de los esfuerzos hechos en estos programas de monitorización de la apnea, las tasas de SMSI no disminuyeron (Hodgman y Hoppenbrouwers, 1988). La monitorización cardiorrespiratoria de los infantes muertos de SMSI no es realmente consistente con la hipótesis de apnea (Poets, 2004).

Tonkin postuló que la obstrucción de las vías aéreas al nivel de la faringe posterior durante la relajación del músculo, lo que ocurre durante la fase REM del

sueño, puede conducir a la hipoxia, al paro cardíaco y finalmente a la muerte (Tonkin, 1975). Esto puede ser facilitado por ejemplo en los casos en los que los niños poseen una mandíbula con hipermovilidad durante la infancia. Además, la posición en *decúbito prono* (tendido boca abajo y la cabeza de lado) durante el sueño puede empujar la mandíbula hacia atrás, produciendo la oclusión de las vías aéreas.

En 1972, Abramson concluyó que la mayoría de las muertes por SMSI se debieron a episodios de asfixia por ropa de cama (Abramson, 1972). En 1991 Kemp y Thach describieron 25 muertes súbitas en infantes que dormían en posición de decúbito prono en cojines rellenos con perlas de poliestireno. Argumentaron que la muerte fue debida a la reinhalación de los gases expirados. Modelos mecánicos mostraron que la ropa de cama blanda, particularmente edredones y pieles de oveja, pueden acumular dióxido de carbono (Bolton y col., 1993); pero en un modelo animal cubriéndole la cabeza con ropa de cama blanda no le llegaba a producir hipoxia y la presión parcial de CO₂ disminuyó (Galland y col., 1994), concluyeron en este estudio que la cobertura de la cabeza a los animales les podría producir estrés térmico más bien que asfixia.

Según citan en 2009 Levitsky y López-Barneo la disminución de la expresión de los canales T en células cromafines puede ser una de las causas del SMSI, un cuadro asociado a la disminución de la excitabilidad del quimiorreceptor de oxígeno. Algunos estudios clínicos sugieren que fumar cigarrillos es uno de los principales factores de riesgo para la aparición del SMSI, ya que la nicotina crónica *in utero* suprimiría la sensibilidad a hipoxia de las células cromafines (Buttigieg y col., 2008), este descenso en la vital secreción de catecolaminas frente al estímulo hipóxico dificultaría al neonato a adaptar su sistema respiratorio, cardiovascular y el resto de funciones metabólicas a las nuevas condiciones que demanda la vida extrauterina, lo que se traduciría en un descenso de la capacidad de supervivencia.

Los resultados de esta tesis ponen de manifiesto que tanto la despolarización como la secreción de catecolaminas inducida por hipoxia están mayoritariamente controladas por el CCDV de tipo L (α_{1D} , Cav1.3) en CCER. Una disminución en la actividad del CCDV de tipo L elimina la sensibilidad a la hipoxia en la célula cromafín, aumentando el riesgo de muerte durante la vida fetal y en el momento del nacimiento e

incrementando probablemente también los casos de SMSI. Estos datos pueden tener una importancia terapéutica y fisiopatológica, ya que fármacos moduladores o activadores de la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV de tipo L, podrían ser usados para asegurar una saludable fuente de catecolaminas que pudiera prevenir el daño cerebral causado por el gran estrés hipóxico durante el nacimiento y en los primeros momentos de vida del neonato, y a su vez disminuir el riesgo del SMSI.

HIPÓTEIS Y OBJETIVOS

3.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La importancia de la célula cromafín se ha puesto de manifiesto a lo largo de varias décadas en las que miles de trabajos científicos han sido publicados utilizando este modelo celular. No solo ha sido importante su estudio desde el punto de vista de las funciones que cumplen las neurohormonas que produce y secreta; frente a situaciones de estrés como un estímulo de amenaza o de percepción de peligro esta célula vierte al torrente sanguíneo grandes cantidades de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) que son esenciales para conseguir preparar al organismo para dar una respuesta adecuada a dicho estrés mediante una serie de cambios fisiológicos necesarios.

Tiene aun mayor relevancia el hecho de que la célula cromafín ha sido ampliamente empleada como modelo neurosecretor y una grandísima parte de lo que se conoce sobre la liberación exocitótica de neurotransmisores se lo debemos gracias a estudios realizados en este modelo celular. Es también un excelente modelo para estudiar la modulación de los CCDV y los movimientos intracelulares de Ca^{2+} así como del resto de corrientes iónicas.

El laboratorio ITH-1 del profesor Antonio García García trabaja desde hace casi 40 años con este modelo celular, con el objetivo de ampliar el conocimiento que tenemos sobre los mecanismos básicos implicados en la comunicación neuronal teniendo al ión Ca^{2+} como eje central y principal protagonista. Nos interesa estudiar el ciclo celular del Ca^{2+} , vital para el proceso neurosecretor y para el mismo mantenimiento celular. Nos hemos especializado en el estudio de las señales celulares del Ca^{2+} y nuestros esfuerzos siempre están muy enfocados en investigar la entrada de Ca^{2+} vía CCDV, los transientes de calcio citosólicos que ocurren durante la excitación celular y la resultante final del proceso exocitótico, la fusión calcio-dependiente de las vesículas cromafines con la membrana celular.

Nuestro grupo que ha realizado ingentes aportaciones a lo largo de todos estos últimos años en el conocimiento de estos parámetros en la célula cromafín, con decenas

de artículos publicados; el 100 % de sus esfuerzos los habían realizado sobre el modelo de célula cromafín obtenidas siempre de animales adultos, ya fuesen vacas, gatos, rata, ratón e incluso cromafines humanas. Pero esto cambió con mi llegada al ITH en el mes de junio de 2007 y el planteamiento del que sería mi futuro Proyecto de Investigación por parte de mi Director y Codirector de Tesis Doctoral.

De las decenas de miles de publicaciones que aparecen en la literatura científica tras realizar una simple búsqueda en *PubMed* bajo el término de búsqueda “*chromaffin cell*” éstas se reducen a solo unos pocos cientos si este término se cambia por “*embryo chromaffin cell*” o “*fetal chromaffin cell*” y a tan solo unas decenas si el término a buscar es “*rat embryo chromaffin cell*”.

Queríamos entonces dar un paso y comenzar a estudiar la célula cromafín en sus estadios más inmaduros, puesto que el conocimiento que se tenía sobre la célula cromafín embrionaria era infinitamente menor del que se tiene sobre la adulta; sin embargo la importancia fisiológica de esta célula cromafín embrionaria puede ser incluso superior al atribuido a la célula cromafín adulta.

Si tenemos en cuenta lo relativamente poco que se sabe hasta el momento de la célula cromafín embrionaria ésta recupera un protagonismo fisiológico fundamental por si misma, no ya como “*modelo neurosecretor*” sino que la célula cromafín embrionaria juega un papel vital en la adaptación al estrés por parte del embrión y las catecolaminas liberadas son esenciales para accionar una serie de cambios cardiovasculares, respiratorios y metabólicos que son imprescindibles para la adaptación del feto a la vida extrauterina y de los cuales depende su supervivencia. Aparte de todo esto que hemos expresado ampliamente en la introducción de esta tesis, los mecanismos neurogénicos que controlan la actividad de la célula cromafín están presentes en la célula cromafín adulta y no existen en la célula cromafín embrionaria, lo que ya de por si resulta realmente atractivo; pero además esta célula cromafín embrionaria va a adquirir una función vital para el organismo inmaduro tan importante como es la de poseer la capacidad de detección de la pO_2 en la sangre, de cuya correcta regulación depende la vida de cualquier mamífero.

Todos estos argumentos fueron los que nos lanzaron a estudiar en profundidad la célula cromafín embrionaria, bajo la tutela del profesor Antonio García García y del Dr. Anotio Miguel García de Diego pusimos en marcha un nuevo Proyecto de Investigación que se enmarcó genéricamente en el contexto de la hipótesis de “*la triada funcional*” y particularmente en los factores que regulan la exocitosis durante la vida fetal. Queríamos además hacer un estudio comparado, aprovechando las glándulas adrenales de la rata madre. ¿Qué diferencias podríamos llegar a encontrar entre la célula cromafín embrionaria y la celula cromafin de la rata madre? Nadie se había embarcado hasta el momento en realizar un estudio de desarrollo detallado sobre la célula cromafín de rata; por ello, la idea resultaba realmente atractiva.

Tras realizar los primeros cultivos primarios “*saltaba a la vista*” que posiblemente muchos aspectos ultraestructurales y fisiológicos no conocidos hasta la fecha podrían diferir entre ambos tipos celulares. Resultaba extraordinariamente llamativo la diferencia en la talla entre un tipo celular y otro, la cromafín embrionaria de rata era el símil de una moneda de “*cinco céntimos de euro*” en comparación con la cromafin adulta que sería de la talla de una moneda de “*un euro*”. Definitivamente no era arriesgado hipotetizar que estos dos tipos celulares a pesar de pertenecer a la misma especie posiblemente tendrían muchas diferencias entre sí. Fue entonces cuando un montón de preguntas nos comenzaron a asaltar y comenzamos a fijar una serie de objetivos científicos para dar respuesta a cada una de ellas, los cuales se enumeran a continuación en la siguiente lista:

1.- Conocida la distribución de los distintos subtipos de CCDV en la célula cromafín de rata adulta planteamos el estudio meticuloso de esta distribución en la CCER. Además, nos planteamos descifrar la contribución relativa de cada subtipo de CCDV a la exocitosis frente a distintos estímulos despolarizantes de alto K^+ ; para ello obtuvimos registros de las vesículas exocitadas mediante la técnica de amperometría.

2.- Puesto que tuvimos un número consistente de respuestas amperométricas, estudiamos las posibles diferencias en los *patrones de secreción* entre CCER y CCM (medidos como frecuencia del número de espigas y carga amperométrica total contenida a lo largo de los distintos estímulos despolarizantes de alto K^+).

3.- Ya que el número de eventos exocitóticos que conseguimos fue elevado tuvimos la ambición de poder estudiar la dinámica del poro de fusión, mediante un análisis de los eventos exocitóticos de espiga única tanto de CCER como de CCM, realizando un análisis exhaustivo tanto del tamaño cuantal de los mismos como de los parámetros cinéticos.

4.- Puesto que encontramos diferencias en los patrones de secreción entre ambos tipos celulares planteamos realizar un estudio comparativo de la ultraestructura de estos dos tipos de célula cromafín, mediante el análisis de secciones de las glándulas adrenales y la obtención de micrografías en un microscopio electrónico de transmisión, con ello podríamos dar respuesta a estas cuestiones.

5.- ¿Son los distintos contingentes vesiculares similares entre la célula cromafín embrionaria y la célula cromafín adulta de rata madre? ¿Hay diferencias en los eventos exocitóticos aislados durante el desarrollo de la célula cromafín de rata? ¿Dependen solo de la edad o también del tipo de estímulo? Para ello nos planteamos realizar un *estudio comparativo* de los parámetros cinéticos y de su contenido cuantal comparando tanto entre los diferentes estímulos despolarizantes ($25K^+$, $75K^+$) e hipoxia como analizando las posibles diferencias entre ambos tipos de células cromafines. Para realizar este objetivo nos servimos además de la técnica de *amperometría en célula única*, de la técnica de *patch-clamp* y del protocolo de doble pulso despolarizante o de pulsos cuadrados pareados.

6.- También estudiamos la excitabilidad celular en la cromafín embrionaria para discernir si existen diferencias con respecto a la célula cromafín adulta de rata madre.

7.- Además procuramos estudiar la contribución relativa de los distintos subtipos de CCDV en la respuesta secretora a hipoxia, disecando tanto el papel de los CCDV de bajo umbral de activación o tipo T y de los distintos subtipos de CCDV de alto umbral de activación. De igual forma analizamos los posibles patrones que rigen esta respuesta secretora a hipoxia en la CCER.

8.- Ya que se le ha atribuido un papel protagonista en el control de la respuesta secretora a hipoxia al CCDV de bajo umbral de activación o tipo T, y que en muchos de esos trabajos se han utilizado un serie de compuestos a unas concentraciones a las que su efecto puede ser controvertido; planteamos como objetivo secundario examinar los efectos de Ni^{2+} , mibefadilo y NNC 55-0396. Pueden estos compuestos estar ejerciendo además otras acciones sobre otros subtipos de CCDV o sobre otras corrientes iónicas.

9.- Finalmente estudiamos las diferencias en la dinámica del ciclo del Ca^{2+} entre la CCER y la CCM, y por consiguiente la respuesta exocitótica subyacente. También nos preguntamos si la mitocondria o el retículo endoplásmico contribuían de forma diferencial a la regulación de las señales del calcio y a la exocitosis en ambos tipos de células.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cultivo de células cromafines

4.1.1 Aislamiento y cultivo de células cromafines embrionarias de rata (CCER)

Todos los procedimientos experimentales con animales se llevaron a cabo siguiendo las directrices marcadas por el Comité Ético de la Facultad de Medicina de la *Universidad Autónoma de Madrid* para el cuidado y la utilización de animales de investigación; directrices que están en conformidad con las marcadas por la Directiva del Parlamento Europeo del 22 de Septiembre de 2010 (2010/63/EU) y con el Real Decreto Español del 10 de Octubre de 2005 (RD 1201/2005). Se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento animal. Las ratas Wistar madres (modelo animal mayoritariamente utilizado en los estudios para la elaboración de esta tesis) fueron ubicadas individualmente bajo condiciones controladas de iluminación y temperatura, provistas de alimento y agua *ad libitum*.

Las células cromafines se obtuvieron de embriones de rata de 18 días de desarrollo (E18) mediante un protocolo descrito para ratón con algunas modificaciones (Sorensen *et al.*, 2003): Las ratas Wistar preñadas se sacrificaron por decapitación y los fetos fueron rápidamente extraídos e inmediatamente decapitados sobre una plataforma de hielo, encontrándose en todo momento bañados por una solución salina fría denominada Locke 1X. Las glándulas adrenales fueron posteriormente extraídas de los embriones, limpiada la grasa de su alrededor e introducidas en 1 ml de una solución enzimática de composición idéntica a la descrita por Sorensen *et al.* (2003). Se añadió papaína (15-20 unidades/ml) y las glándulas adrenales de los embriones fueron digeridas durante 10 minutos; posteriormente se añadieron 750 µl de otra solución, denominada inhibidora, dirigida a parar la reacción enzimática, y las glándulas adrenales de los embriones se mantuvieron en esta solución durante otros 5 min.

A continuación esta solución fue intercambiada por 1 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que había permanecido en el baño de cultivo termostatzado y se encontraba a 37 °C y las glándulas fueron disgregadas mecánicamente en pequeñas fracciones utilizando inicialmente una micropipeta p1000, en su volumen máximo de 1000 µl, mediante un suave y repetitivo pipeteo reproducido de 10 a 20 veces. Después, utilizando una micropipeta p200, habiendo seleccionado un volumen aproximado de 150 µl, se realizó de nuevo otro pipeteo durante otras 10 a 20 repeticiones, hasta observar como la suspensión donde estaban las glándulas se va haciendo homogénea y desaparecen las grandes estructuras de tejido que configuraban las glándulas. A esta solución de 1 ml de DMEM que contiene las células cromafines disgregadas, se le añade 9 ml más de DMEM, se filtra a continuación a través de una malla de nylon de 80 µm de poro y se centrifuga durante 10 min a 800 rpm para eliminar restos de los diferentes tejidos que permanecen junto a las células cromafines.

El sobrenadante fue eliminado y se añadieron entre 600 µl y 1200 µl de DMEM para obtener una solución final de cultivo con las células cromafines. Una gota de 50 µl a 100 µl de esta solución que contenía las células cromafines fue plantada en cubreobjetos de vidrio de 12 ó 25 mm de diámetro, cubreobjetos que previamente habían sido tratados con una aplicación uniforme en el centro de los mismos de poli-L-lisina 1X (0.1 mg/ml) durante 15-30 min, posteriormente lavados de la poli-L-lisina 1X (0.1 mg/ml) con agua Milli-Q y dejados secar en la campana de flujo laminar. Los cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro con una gota de 100 µl de la suspensión celular se distribuían en 1 placa multipocillo 6X destinada a experimentos de medidas de calcio citosólico; mientras que los cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro, con una gota de 50 µl de la suspensión celular, habían sido distribuidos en 1 placa multipocillo de 12X que se destinaba a experimentos de amperometría y patch-clamp.

Posteriormente ambas placas multipocillo sembradas con las células cromafines permanecieron durante 1 h en el incubador; pasado este tiempo se añadió a cada pocillo 1 ml de medio de cultivo (DMEM) en el caso de las placas multipocillo 12X y 2 ml de DMEM en el de las placas multipocillo 6X. El DMEM se encontraba suplementado con 5% de suero bovino fetal, 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina. Las placas multipocillo con las células cromafines sembradas y una vez añadido el medio de

cultivo fueron mantenidas en un incubador saturado de humedad, a 37 °C y con una mezcla de 5 % CO₂ / 95 % de aire atmosférico. Los experimentos fueron llevados a cabo en las células cromafines embrionarias de 1 a 7 días después de haberse realizado el cultivo.

4.1.2 Aislamiento y cultivo de células cromafines de la rata madre (CCM)

De igual forma se extrajeron las glándulas adrenales de la rata madre. Las células cromafines fueron obtenidas por la aplicación de un protocolo similar al anteriormente descrito con ligeras diferencias; por ejemplo, previo a la digestión, la médula adrenal se disecó y se separó del resto de la glándula adrenal, se añadieron 40 unidades/ml de papaína a la solución enzimática, y el tiempo de digestión fue superior, en torno a 50-60 min.

4.1.3 Aislamiento y cultivo de células cromafines bovinas (CCB)

Las células cromafines bovinas se aislaron de glándulas adrenales de terneras jóvenes de aproximadamente un año de edad, siguiendo métodos estandarizados (Livett, 1984) con algunas modificaciones (Moro y col., 1990). Durante el traslado de las glándulas adrenales desde el matadero de Leganés y durante la elaboración del cultivo las glándulas se mantuvieron en medio Locke 1X constantemente enfriado (2 °C-5°C) para evitar la descomposición de los tejidos.

Las células se suspendieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que se encontraba suplementado con 3.5 % de suero bovino fetal, inhibidores de fibroblastos (10 µM de citosina arabinósido, 10 µM de fluorodeoxiuridina y 10 µM de L-leucina metil ester (L-LME), 50 IU/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina.

Para los experimentos de secreción de catecolaminas en célula aislada mediante la técnica de amperometría y los registros de corrientes iónicas mediante la técnica de patch-clamp las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro que previamente habían sido tratados con poli-L-lisina 1X (0.1 mg/ml) durante 30 min, posteriormente lavados de la poli-L-lisina 1X (0.1 mg/ml) con agua Milli-Q y dejados

secar en la campana de flujo laminar. Para realizar los registros de los transientes de calcio citosólico mediante la técnica de microscopía de fluorescencia las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro también tratados con poli-L-lisina 1X (0.1 mg/ml). Las células se mantuvieron de 1 a 4 días en un incubador a 37 °C, saturado de humedad y generando este una mezcla de 5 % CO₂ / 95 % de aire atmosférico. Los experimentos se realizaron transcurridas 24 h desde su siembra, y hasta el cuarto día de la misma.

4.2 Soluciones utilizadas en la elaboración de los medios de cultivo y en los procedimientos experimentales

4.2.1 Medio de cultivo para células cromafines: Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)

El medio DMEM se obtiene como una modificación simple del Medio Basal de Eagle (BME), en el cual se ha aumentado cuatro veces más la concentración de vitaminas y aminoácidos y de dos a cuatro veces la concentración de glucosa. De forma adicional contiene hierro inorgánico y rojo de fenol (también llamado Fenolsulfoftaleína, Sulfental, Sulfonftal o PSP) que actúa como un indicador de pH. A pH inferiores a 6'8, el cultivo vira a amarillo, a pH superiores a 8 el cultivo se torna de color rojo, los pH entre 6'8 y 8 dan tonalidades graduales de color naranja. Estas modificaciones hacen que este medio de cultivo sea de los más adecuados para más tipos celulares. El DMEM utilizado en nuestros cultivos ha sido adquirido de la casa comercial Gibco®, en formato polvo (Tabla 3.2) (con piruvato adicionado y baja concentración de glucosa (1g/l)). Este polvo se disuelve en 1L final de agua Milli-Q y se añaden los componentes y antibióticos que se detallan a continuación (Tabla 3.1).

En resumen, al DMEM en polvo de Gibco® le añadimos bicarbonato de sodio, HEPES, e incrementamos las concentraciones de algunos compuestos que ya trae consigo como la de D-glucosa (se le adicionan 5.5 mM más) y L-glutamina (se le adicionan 2.0 mM más) (Tabla 3.1). Posteriormente se añaden los antibióticos señalados (Tabla 3.1), suero bovino fetal (3.5 % en el caso del cultivo de CCB ó 5 % en el caso de los cultivos de CCER y CCM); y en el caso del cultivo de CCB se incorporan

inhibidores de fibroblastos (10 μ M de citosina arabinósido, 10 μ M de fluorodeoxiuridina y 10 μ M de L-LME).

Componentes	Concentración [g/l]	Concentración [mM]	Concentración [μ g/ml]	Concentración [UI/ml]
DMEM Gibco® (polvo)	9,9			
HNaCO ₃	2,2	26,2		
HEPES	2,38	10		
D-glucosa	1	5,5		
L-glutamina		2		
ANTIBIÓTICOS				
Penicilina				50
Estreptomicina			50	
Gentamicina			50	

Tabla 3.1- Componentes utilizados para elaborar el medio de cultivo DMEM que hemos usado en todos nuestros cultivos. Partimos de un medio DMEM en polvo que compramos a la casa comercial Gibco (DMEM Gibco® (polvo)) y lo suplementamos con HNaCO₃ y HEPES; incrementamos las concentraciones de D-glucosa y L-glutamina que ya trae el polvo de por sí. Se añaden los antibióticos detallados en la tabla e inhibidores de fibroblastos para los cultivos de CCB.

Componentes DMEM Gibco® (polvo)	Concentración (mg/L)	Concentración (mM)
AMINOÁCIDOS		
Glicina	30	0,4
Hidrocloreuro de L-arginina	84	0,398
L-cisteína X 2H ₂ O	63	0,201
L-glutamina	584	4
Hidrocloreuro de L-histidina X H ₂ O	42	0,2
L-isoleucina	105	0,802
L-leucina	105	0,802
Hidrocloreuro de L-lisina	146	0,798
L-metionina	30	0,201
L-fenilalanina	66	0,4
L-serina	42	0,4
L-treonina	95	0,798
L-triptófano	16	0,0784
Sal disódica dihidratada de L-tirosina	104	0,398
L-valina	94	0,803
VITAMINAS		
Cloruro de colina	4	0,0286
D-pantotenato de calcio	4	0,00869
Ácido fólico	4	0,00907
Niacinamida	4	0,0328
Hidrocloreuro de piridoxina	4	0,0196
Riboflavina	0,4	0,00106
Hidrocloreuro de tiamina	4	0,0119
i-Inositol	7,2	0,04
SALES INÓRGANICAS		
Cloruro de calcio (anhidro)	200	1,8
Nitrato férrico X 9H ₂ O	0,1	0,000248
Sulfato de magnesio (anhidro)	97,67	0,814
Cloruro de potasio	400	5,33
Cloruro de sodio	6400	110,34
Fosfato de sodio monobásico X 4H ₂ O	125	0,906
OTROS COMPONENTES		
D-glucosa	1000	5,56
Rojo de fenol	15	0,0399
piruvato de sodio	110	1

Tabla 3.2- Componentes presentes en el DMEM en polvo de la casa comercial Gibco —DMEM Gibco® (polvo)—. En resumen, este medio de cultivo está compuesto

de toda una serie de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y otros compuestos como la D-glucosa, el rojo de fenol y el piruvato de sodio.

4.2.2 Solución salina utilizada en el transporte de las glándulas y en la elaboración de los cultivos: Solución de Locke 1X

El Locke es una solución acuosa de cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de potasio, bicarbonato de sodio y D-glucosa a la que se le añade el tampón HEPES para mantener el pH. La solución se ajusta hasta el pH de 7.4 con 1M NaOH. Ha sido una solución muy utilizada en experimentos fisiológicos *in vitro* de corazón aislado, logrando mantener el corazón pulsátil una vez que ha sido extirpado. También ha sido llamada solución de Ringer-Locke. Hemos utilizado la solución de Locke 1X como medio donde mantener las glándulas adrenales de embriones de rata y de rata madre durante el transporte desde el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid hasta el laboratorio L1. Nada más ser extirpadas las glándulas adrenales estas eran introducidas en este medio enfriado con hielo.

De igual forma las glándulas adrenales de vaca eran transportadas en Locke 1X convenientemente enfriado desde el matadero de Leganés hasta el laboratorio 1. Se ha utilizado esta solución salina enfriada durante la elaboración de los cultivos: en la disección de la médula adrenal de la rata madre, durante la limpieza de las glándulas adrenales de rata embrionaria; y en caliente (a 37 °C) durante la limpieza de las glándulas adrenales bovinas, mientras se realiza la disección de la médula adrenal bovina y la purificación de las células cromafines mediante centrifugaciones.

Durante todo el trabajo experimental hemos partido de una solución de Locke 10 veces más concentrada (Locke 10X), a la que hemos aplicado una dilución 1/10 en agua Milli-Q para preparar 1L de solución salina fresca cada semana (Locke 1X). A este Locke 1X se le añaden los antibióticos penicilina (50 IU/ml) y estreptomycin (50 µg/ml). La composición exacta de la solución de Locke 1X utilizada se detalla a continuación en la tabla 3.3.

Componente	Concentración (mM)
NaCl	154
KCl	5,5
NaHCO ₃	3,6
D-glucosa	5,5
HEPES	10

Tabla 3.3- Componentes utilizados para elaborar la solución salina Locke 1X. A estos se añaden los antibióticos penicilina (50 IU/ml) y estreptomicina (50 µg/ml).

4.2.3 Solución salina de Tyrode 1X y soluciones despolarizantes de alto potasio

La solución de Tyrode es una solución salina aproximadamente isotónica con respecto al fluido intersticial que es usada en experimentos de fisiología, cultivos de tejidos, preservado de órganos e irrigaciones de la cavidad peritoneal; se considera una modificación de la solución de Locke 1X. Se ha utilizado esta solución para perfundir continuamente los cubreobjetos con las células cromafines mientras se realizan los distintos experimentos; en el momento de llevar a cabo los experimentos las cantidades apropiadas de las soluciones madre frescas de los distintos fármacos utilizados fueron disueltas en un volumen determinado de solución de Tyrode; también utilizamos esta solución para sumergir los cubreobjetos de vidrio con las células cuando se sacan del incubador y se transportan hasta los distintos equipos donde se van a realizar los experimentos.

Los cubreobjetos se montaron en una cámara de fabricación casera desarrollada por SEGAINVEX; esta cámara se situaba sobre un microscopio invertido Nikon Diaphot utilizado para localizar la célula diana a estudiar; dicha célula fue continuamente bañada por medio de un sistema de perfusión que consta de cinco vías de entrada y una única salida común de líquido; cada una de las cinco vías de entrada se encuentra controlada por una electroválvula que comanda su apertura y cierre. La solución de Tyrode utilizada en los experimentos está compuesta de los siguientes elementos disueltos en agua Milli-Q (expresada su concentración en mM): 137 NaCl, 1

MgCl₂, 5.3 KCl, 2 CaCl₂, 10 HEPES y 10 D-glucosa. El pH se ha ajustado a 7.3 con 1 M de NaOH.

Como una herramienta para despolarizar las células cromafines, producir la apertura de CCDV y la subsiguiente secreción de catecolaminas nos hemos servido de soluciones de Tyrode con un alto contenido en K⁺, que han sido elaboradas reemplazando equiosmolarmente la concentración de NaCl por la de KCl. De esta forma se han creado soluciones de Tyrode-25K, Tyrode-45K y Tyrode-75K con 25, 45, y 75 mM de KCl respectivamente en lugar de los 5.3 mM de KCl que tiene el Tyrode habitual. Cada una de estas soluciones se ha utilizado en experimentos concretos dependiendo del grado de despolarización que queríamos establecer sobre las células cromafines. La composición detallada de cada una de ellas se muestra en la siguiente tabla:

	Tyrode	Tyrode-25K	Tyrode-45K	Tyrode-75K
Componente	Concentración (mM)			
NaCl	137	117,3	97,3	67,3
KCl	5,3	25	45	75
MgCl ₂	1	1	1	1
CaCl ₂	2	2	2	2
HEPES	10	10	10	10
D-glucosa	10	10	10	10

Tabla 3.4- Componentes utilizados para elaborar la solución salina de Tyrode y las distintas soluciones despolarizantes de alto potasio a partir de la solución de Tyrode (Tyrode-25K, Tyrode-45K y Tyrode-75K). Al utilizarse estas soluciones en los experimentos diarios con células que se van a desechar tras ser utilizadas, no es necesario la presencia de antibióticos en estos medios.

4.2.4 Solución salina utilizada en los experimentos de hipoxia

La solución utilizada en los experimentos de hipoxia ha sido una solución salina de tampón bicarbonato, que mantiene un pH de 7.3-7.4 cuando es burbujeadada con CO₂. Es una solución salina muy utilizada en experimentación con cultivos primarios de neuronas y especialmente en rodajas de hipocampo (Moro y col., 1998). En inglés esta solución es conocida como “*BBS (Bicarbonate-Buffered Solution) hippocampal slices*”.

El tampón químico o la solución de tampón bicarbonato que elaboramos imita a nivel biológico al sistema de tampón bicarbonato tan importante en muchos procesos celulares diferentes, siendo uno de los principales sistemas de amortiguación del pH de la sangre de los mamíferos que mantiene la homeostasia ácido-base de los tejidos vivos.

El tampón bicarbonato está compuesto por ácido carbónico (H_2CO_3) y bicarbonato (HCO_3^-) y el valor de su pK_a es de 6,1. Es el tampón más importante de la sangre ($\text{pH}=7,4$), representa el 75% de la capacidad amortiguadora total de la sangre. También está presente en el líquido intersticial. Es un tampón muy eficaz porque la relación $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ es muy alta, lo que supone una alta capacidad para amortiguar los ácidos. Supone una ventaja el hecho que se trata de un sistema abierto ya que el CO_2 puede ser eliminado en la respiración muy rápidamente, los H^+ se pueden eliminar por vía renal y el HCO_3^- puede reemplazarse en la orina. La solución salina tamponada con bicarbonato utilizada en los experimentos de hipoxia estaba compuesta (en mM) de: 120 NaCl, 2 KCl, 26 NaHCO_3 , 1,18 KH_2PO_4 , 11 D-glucosa, 1,19 MgSO_4 , 2 CaCl_2 . Cuando se elabora esta solución el último elemento que se adiciona es el CaCl_2 . Tras hacerlo vemos que la solución toma un color blanquecino ya que el CaCl_2 no se ha disuelto correctamente; por ello debemos burbujear durante al menos 15 min la solución con CO_2 para que el pH de la solución se aproxime a 7.4 y facilite la disolución del CaCl_2 .

Componente	Concentración (mM)
NaCl	120
NaHCO_3	26
KCl	2
KH_2PO_4	1,18
MgSO_4	1,19
D-glucosa	11
CaCl_2	2

Tabla 3.5- Componentes utilizados para elaborar la solución salina de tampón bicarbonato. Esta solución ha sido utilizada para realizar todos los experimentos de hipoxia. Decidimos utilizar esta solución para estos experimentos en cuestión ya que ha sido muy utilizada en experimentos de privación de oxígeno y glucosa; además contiene un tampón fisiológico para regular el pH, al igual que sucede en la sangre que circula por los capilares sanguíneos que bañan las células cromafines embrionarias, donde en situaciones fisiológicas se estaría promoviendo un déficit en el aporte de

oxígeno por parte de los capilares hacia los glomérulos de células cromafines embrionarias, promoviendo una secreción de catecolaminas por parte de estas que son recogidas por los capilares sanguíneos (ver Figura 4.3 de la Introducción).

Con esta solución hemos sometido a las células cromafines embrionarias de rata al estímulo de hipoxia; para ello los recipientes (jeringas individuales de 12 ml) que contienen la solución salina y que conectan con el sistema de perfusión fueron continuamente burbujeados ya sea con una mezcla de 95% aire / 5 % CO₂ (solución de normoxia) o de 95 % N₂ / 5 % CO₂ (solución de hipoxia/anoxia). Antes de situar la solución en los distintos recipientes de normoxia e hipoxia en nuestro sistema de perfusión, hemos burbujeado un volumen de 100 ml de la misma con la solución de normoxia para asegurarnos que la solución mantiene el valor del pH en torno a aproximadamente 7.4.

Estos recipientes fueron herméticamente cubiertos por todas partes salvo por un pequeño agujero por donde era introducida una aguja que transportaba el gas mediante unos tapones de plastilina y película autosellante (Parafilm®) que evitaba el intercambio masivo de gases con el exterior. Hemos dejado pasar un mínimo de 30 min burbujeando los distintos recipientes de hipoxia y normoxia antes de comenzar los experimentos para asegurarnos que el N₂ ha desplazado a todo el oxígeno de la solución de hipoxia. Transcurrido este tiempo el porcentaje de oxígeno fue medido usando un oxímetro marca Ecoscan Do 6 (Eutech Instruments, Nijkerk, Holanda). En los recipientes de hipoxia la solución alcanzaba prácticamente una anoxia completa y en la vía de salida del sistema de perfusión, donde la solución está en contacto íntimo con las células, el porcentaje de oxígeno oscilaba entre un 5 % y un 10 %. La solución de perfusión es remplazada de los alrededores de la célula en menos de 1 s.

4.3 Técnica de amperometría en célula única

4.3.1 Generalidades

Las técnicas voltamétricas como la amperometría es una de los varios métodos electroanalíticos que se han utilizado en química analítica. Estos métodos estudian un

determinado compuesto mediante la medida del potencial eléctrico (voltios) y/o la corriente eléctrica (amperios) en una determinada cubeta electrolítica que contiene la molécula. Las técnicas voltamétricas aplican un potencial constante o variable en la superficie de un electrodo y se recogen unas medidas de corriente eléctrica resultante mediante un sistema de tres electrodos (por un lado está el electrodo de trabajo o electrodo de estimulación que hace las veces de electrodo de recepción y por otro el electrodo de referencia que toma contacto con la solución salina en la que está inmerso el compuesto a estudiar, cerrando el circuito eléctrico). Estas técnicas en la práctica son unas técnicas no destructivas ya que solo una muy pequeña cantidad de moléculas se consumen en la superficie de los electrodos de trabajo y de referencia.

Cualquier molécula que pueda ser oxidada o reducida es candidata para la detección amperométrica. La forma más simple de la detección amperométrica es la aplicación de un voltaje constante o corriente directa, denominada como *amperometría*. Normalmente, el voltaje elegido ha de exceder el potencial redox del compuesto de interés en al menos 200 mV; se toma este sobrepotencial con el fin de acelerar la tasa de oxidación del compuesto. Como ventaja frente a otras técnicas de voltametría, la amperometría proporciona mayor resolución temporal de las medidas de secreción. Esta particularidad de esta técnica hizo que fuera el abordaje usado para obtener medidas de los pies de espiga en células cromafines y mastocitos (Chow y col., 1992; Álvarez de Toledo y col., 1993).

Por otra parte, la amperometría proporciona menos información sobre la molécula o moléculas que están siendo oxidadas; esta información sobre la especie química que está siendo estudiada puede ser obtenida usando voltametría cíclica. La voltametría cíclica es otra técnica voltamétrica de detección electroquímica donde un patrón de voltaje periódico (llamado onda triangular) es aplicado al electrodo pudiendo obtener un diagrama del voltaje frente a la corriente (voltamograma) que presenta un determinado número de picos (de oxidación y de reducción) y una localización diferencial de los mismos, característicos de la molécula que está siendo analizada; ya que una molécula determinada tiene un potencial redox y una tasa de transferencia de electrones específica, la voltametría cíclica de un compuesto dado puede proporcionar una “*firma de la molécula*” mediante un “voltamograma tipo” de esa molécula.

Durante el desarrollo de todo el trabajo experimental presente en esta Tesis Doctoral las catecolaminas liberadas de las células cromafines aisladas fueron medidas por amperometría siguiendo los procedimientos que se describen en Wightman y *col.*, (1991) y Chow y *col.*, (1992). El grupo de Mark Wightman logró en 1990 registrar por vez primera la secreción de una única célula cromafín utilizando la técnica de amperometría. Estos mismos autores lograron observar la liberación de las catecolaminas por exocitosis de cada vesícula secretora (Leszczyszyn y *col.*, 1990; 1991). El avance técnico que permitió realizar estas mediciones fueron los sensores electroquímicos en miniatura (microelectrodos de fibra de carbono) que proporcionan una medida directa de lo acontecido en la superficie de la célula.

La amperometría fue la primera aproximación que proporcionó una medida directa del número de moléculas liberadas por cada vesícula, así como de la cinética del proceso de liberación de cada evento exocitótico; y permitió además establecer una relación entre la actividad eléctrica y la secreción. Las técnicas amperométricas se han confirmado como unas herramientas poderosas para poder esclarecer muchos mecanismos implicados en el proceso de acoplamiento estímulo-secreción y en la exocitosis. La amperometría y la voltametría cíclica son ahora técnicas ampliamente usadas para estudiar las respuestas secretoras de células aisladas (por ejemplo mediante la medida de las cantidades totales de sustancias liberadas por las células que son oxidadas) o para estudiar la cinética de la exocitosis (por ejemplo la cinética de liberación de neurotransmisor de las vesículas individuales).

La amperometría es una técnica no invasiva con una elevada sensibilidad y una gran resolución del curso temporal. Además, su uso no produce ningún daño a la célula y aparentemente no afecta al normal funcionamiento de la respuesta secretora. Sin embargo esta técnica tiene algunas limitaciones: solo es capaz de detectar sustancias una vez que el evento de fusión de las vesículas ha ocurrido y el contenido de las vesículas ha difundido a la punta del electrodo, por lo que no podemos saber qué sucede antes de la fusión de las vesículas y durante la formación del poro de fusión. Sólo se pueden detectar aquellas sustancias que pueden ser oxidadas con el potencial que se aplica al electrodo. En ningún caso, de la observación y análisis de los trazos amperométricos, es posible inferir los eventos que ocurren antes de la fusión de la

vesícula secretora (por ejemplo la síntesis o el almacenamiento de los neurotransmisores).

A rasgos generales (posteriormente se verá con mayor detalle) el procedimiento que se sigue para monitorizar eventos amperométricos es el siguiente: con el fin de registrar la fusión de una vesícula cromafín se aproxima un electrodo de fibra de carbono a la superficie de la célula hasta prácticamente rozar con ella. El electrodo es mantenido a un potencial positivo y cuando el contenido catecolaminérgico de una vesícula cromafín que se ha fusionado difunde cerca de la superficie del electrodo, se produce la oxidación de las moléculas de catecolaminas y una transferencia de los electrones resultantes al mismo electrodo. Este trasiego de electrones hacia el electrodo se traduce en un incremento de la corriente eléctrica que adopta la forma de una elevación en el trazado de corriente o de una “*espiga amperométrica*”. La talla de la misma puede ser utilizada para estimar el número de vesículas y la frecuencia en que aparecen las espigas amperométricas da información sobre la probabilidad de sufrir exocitosis. El estudio de los parámetros cinéticos de estas espigas amperométricas aporta información sobre la dinámica del poro de fusión fundamentalmente, y de forma indirecta se pueden inferir también evidencias sobre posibles alteraciones tanto en las proteínas que conforman la maquinaria de la exocitosis como en la normal dinámica del ciclo celular del calcio.

4.3.2 Elaboración de los electrodos de amperometría

Los electrodos de fibra de carbono fueron usados por vez primera por Francoise Gonon en los años 80 para medir sustancias libres en el Sistema Nervioso Central (Gonon y col., 1978). A principios de los años 90, como hemos comentado anteriormente, Wightman y sus colaboradores combinaron la técnica de amperometría con los microelectrodos de fibra de carbono para cuantificar así por vez primera la respuesta secretora de células cromafines individuales. El revestimiento plástico de los electrodos de fibra de carbono fue desarrollado inicialmente en el laboratorio de Erwin Neher (Chow y col., 1992) y se conoce como “*método de Chow*”; diferentes laboratorios desde entonces han realizado variadas modificaciones. Los electrodos utilizados en este trabajo fueron contruidos siguiendo las modificaciones descritas por

Wightman y col, (1991). Los siguientes materiales son necesarios para llevar a cabo el revestimiento plástico de los microelectrodos de fibra de carbono:

1.- **Capilares de vidrio.** Aunque no es algo critico, se recomienda el uso de capilares de vidrio (Figura 3.3B) de pequeño diámetro pero de paredes gruesas. El aislamiento eléctrico mejorará conforme mayor sea la anchura de las paredes del capilar de vidrio. Hemos usado vidrio borosilicatado del tipo 8250 fabricados por Kimble-Kontes® (Querétaro, Mexico) con 1.5/1.8 mm de diámetro y 10 cm de largos.

2.- **Fibra de carbono.** Nuestra fuente más habitual de fibras de carbono ha sido Amoco® (Figura 3.3B) aunque esta empresa ha dejado de fabricarlas actualmente. Otras empresas habituales donde se pueden conseguir fibras de carbono son Alfa Aesar (www.alfa.com) y Cytec Engineered Materials (www.cyttec.com). El rango de diámetros de estas fibras de carbono oscila entre 4 y 30 μm . Para los registros de célula aislada es mejor usar fibras de carbono de 5 a 11 μm de diámetro (Figura 3.1B), en nuestros caso para realizar todos los experimentos de amperometría se han usado fibras de carbono de la marca Amoco® de 10 μm de diámetro. Las fibras de carbono han de ser pulidas y posteriormente calibradas antes de su uso; para ello hay pulidores comerciales disponibles, en nuestro caso hemos usado el micropulidor de puntas de pipeta modelo EG-44 de la marca Narishige (Figura 3.1A).

3.- **Resina Epoxy.** Hay un número amplio de resinas disponibles en el mercado. Hemos usado la resina EPIKOTE-828 producida por Miller-Stephenson (Danbury, Conneticut, USA) y un 14% en peso del curante m-fenilendiamina, fabricado por Aldrich (Steimheim, Alemania). Hemos usado esta resina ya que presenta una elevada fluidez que le permite entrar fácilmente en los finos capilares de vidrio (Figura 3.3B).

4.- **Pulidor de pipetas.** Es muy importante que la punta de la fibra de carbono que configura el electrodo de amperometría tenga un pulido uniforme en su superficie (Figura 3.1C). Los pulidores que utilizan superficies de diamante o alúmina (óxido de aluminio) no son recomendados ya que resultan muy abrasivos y dejan una superficie de pulido sucia y no homogénea.

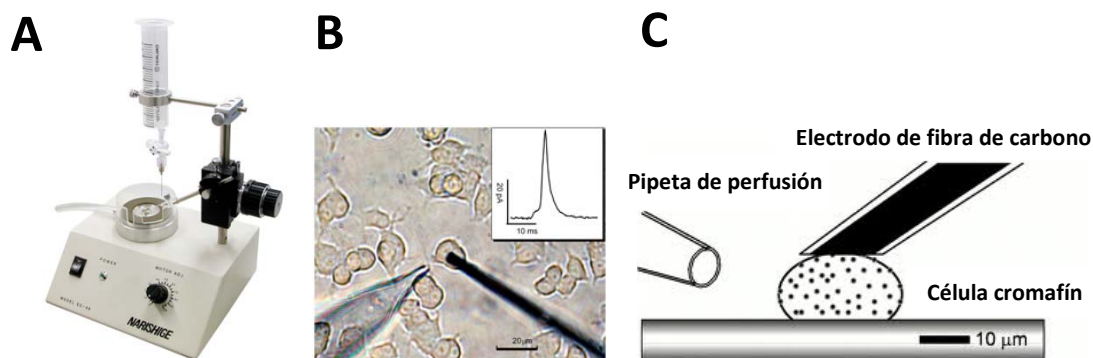


Figura 3.1- Esquema representativo de algunos de los componentes utilizados en la técnica de amperometría. A.- Una imagen del micropulidor de puntas de pipeta modelo EG-44 de la marca Narishige que hemos usado para pulir la punta de las fibras de carbono. B.- Micrografía donde se aprecia en la parte derecha como se sitúa una fibra de carbono sobre una célula cromafín bovina, en el recuadro superior derecho se muestra una espiga amperométrica típica registrada con esta técnica. C.- Esquema ilustrativo de la situación de la pipeta de perfusión o estimulación y del electrodo de fibra de carbono sobre la célula cromafín.

Según la metodología descrita por Wightman y col, (1991) para la elaboración de los electrodos de fibra de carbono, hemos seguido los siguientes pasos que se describen a continuación para la elaboración de nuestros propios electrodos:

1.- Se introduce una fibra de grafito de 10 μm de diámetro (Amoco®) dentro de capilares de vidrio borosilicatado (Kimble-Kontes®). Después estos capilares fueron estirados gracias a un estirador de pipetas (Narishige PC-10®), quedando por cada capilar de vidrio dos pipetas individuales con una fina punta por donde sobresale la fibra de carbono que todavía une ambas pipetas; a continuación se cortó con un par de pequeñas tijeras por la mitad la fibra de carbono que sobresale, obteniendo de este modo dos pipetas individuales con un trozo de fibra de carbono sobresaliendo de cada fina punta.

2.- La fina punta de cada una de las pipetas de vidrio individuales, por donde sobresale la fibra de carbono dejando espacio entre las paredes del vidrio y el grafito, se selló utilizando una resina epoxi (Figura 3.3B) que consta de dos componentes (86 % en peso de la resina EPIKOTE-828 producida por Miller-Stephenson (Danbury, Connecticut, USA) y un 14% en peso del curante m-fenilendiamina, fabricado por Aldrich (Steinheim, Alemania). La mezcla de ambas sustancias se pasó a un tubo de ensayo que se sumergió en un baño de agua. Para producir la mezcla homogénea de la

resina y el curante ha de calentarse la mezcla inmersa en el baño de agua hasta superar los 80°C y una vez se alcanza esta temperatura se puede homogeneizar la mezcla de curante y resina mediante un pipeteo suave con una pipeta pasteur, de la cual hemos cortado 2 cm de la punta para que la resina, que es muy densa, pueda ascender.

Una vez que la mezcla es completamente homogénea adquiere un color rosado y es entonces cuando rápidamente hemos de introducir en ella cada una de las pipetas individuales de vidrio borosilicatado con su correspondiente fibra de carbono; hemos de bañar la fibra de carbono y la parte más fina de la pipeta de vidrio introduciéndola en esta mezcla de forma rápida durante apenas un segundo; rápidamente hemos de reproducir la misma acción con el resto de pipetas con la máxima celeridad pues la mezcla de la resina pese a estar en el baño se va endureciendo con el tiempo, y va a llegar un momento en el que no será útil ya que las fibras de carbono quedarán todas adheridas a ella.

3.- Tras este último paso, los electrodos individuales con la fibra de carbono sellada del exterior por la resina (Figura 3.3B) se dejaron reposar durante 12 h aproximadamente, a lo largo de la noche, secándose; a continuación se introdujeron en un horno a 100 °C por un tiempo de 2 h y posteriormente horneamos las pipetas de amperometría 2 h más a 150 °C. Transcurrido este tiempo, se sacaron del horno para limpiarlos con etanol del resto de resina y suciedad que la parte gruesa del vidrio de la pipeta hubiera podido coger, y se almacenaron hasta su utilización. Los electrodos de fibra de carbono fueron pulidos y calibrados siguiendo las buenas prácticas amperométricas descritas en el trabajo de Machado y col, (2008) antes de poder registrar con ellos.

4.3.3 Procedimiento para la realización de los registros de amperometría

Mediante un sistema de perfusión rápida montado en una pipeta de fabricación casera (Figura 3.2) que presentaba cinco vías de entrada de flujo y una sola vía de salida, lográbamos intercambiar las diferentes soluciones de interés con el medio líquido que rodea las células cromafines. El sistema de perfusión fabricado por SEGAINVEX (Servicios Generales de Apoyo a la Investigación Experimental) de la

UAM, contaba con cinco depósitos para diferentes soluciones, colocados a un metro de altura de la pletina del microscopio; cada uno de ellos consistente en una jeringuilla de 10 ml conectada a tubos Tygon® R3603 de 0.8 mm de diámetro no oxidables y no contaminantes, donde el fluido corre por efecto de la gravedad con una velocidad de flujo de 0.5 ml/min hasta cada una de las cinco vías de la pipeta de perfusión. Por medio de válvulas controladas eléctricamente se regulaba la salida de las diferentes soluciones que pudiera haber en los cinco depósitos; esta acción la realizábamos mediante un controlador de electroválvulas fabricado por SEGAINVEX situado en el “*setup*” exterior. Mediante una manipulador de control manual al cual se encontraba acoplada la pipeta de perfusión (Figura 3.3A), modelo MMN-1 fabricado por Narishige para movimientos más rudimentarios en los tres ejes del espacio, lográbamos acercar la pipeta de perfusión hasta las inmediaciones de la célula que deseábamos registrar.

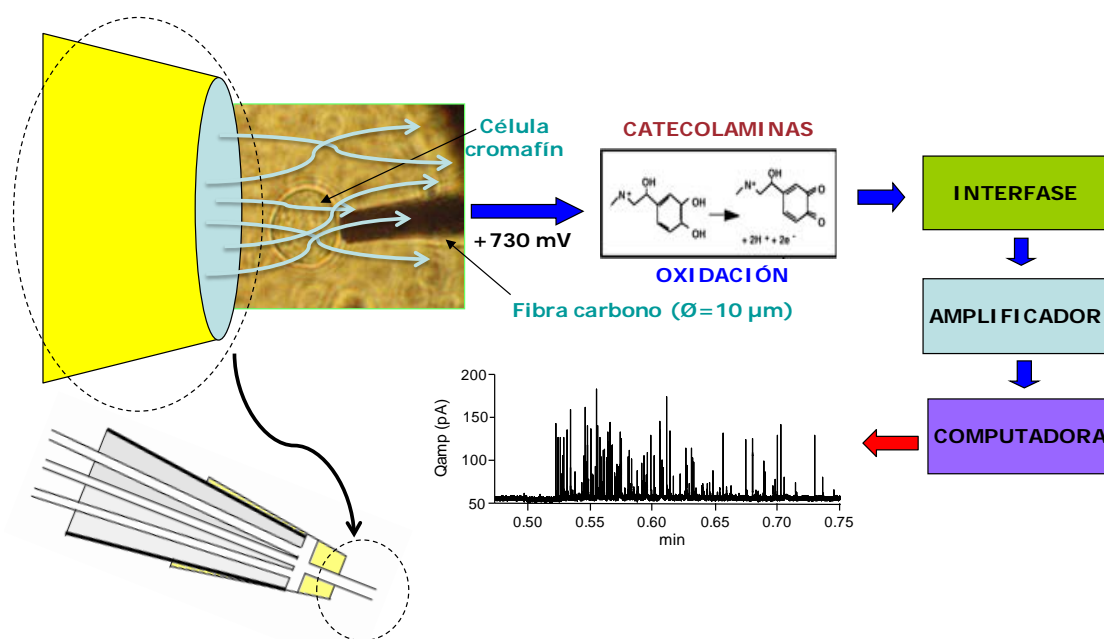


Figura 3.2- Esquema representativo de los componentes presentes en la técnica de amperometría. En la parte más izquierda podemos ver la boca de una pipeta de perfusión o de estimulación donde se muestra la vía de salida y tres de las cinco vías de entrada que tiene (no se representan las cinco vías para simplificar el dibujo). El líquido de perfusión rodea la célula cromafín que está en íntimo contacto con la punta de un electrodo de fibra de carbono de 10 µm de diámetro. Se aplica un voltaje de 730 mV a este electrodo de estimulación y cuando las catecolaminas difunden al exterior, al fusionarse las vesículas cromafines próximas a la punta de la fibra de carbono con la membrana plasmática, estas catecolaminas se oxidan y los electrones resultantes son recogidos de nuevo por la fibra de carbono; esta corriente de electrones es conducida a través de una interfase hasta un amplificador que magnifica la señal transformándola en una corriente amperométrica que es digitalizada en una computadora.

Un micromanipulador hidráulico de aceite de la marca Narishige modelo MP-1 MOD-103 (Figura 3.3A), el cual permite precisos movimientos micrométricos en las tres dimensiones del espacio, nos posibilita interactuar físicamente con la muestra de células cromafines que se encuentra situada sobre un cubreobjetos que colocamos en una pequeña cámara adaptada a la platina de un microscopio invertido marca Nikon Diaphot usado para localizar la célula diana (Figura 3.3A). A este micromanipulador se encuentra unido el amperómetro mediante un adaptador, permitiendo su movimiento en los tres ejes del espacio, y el amperómetro presenta un soporte donde fijar los electrodos de fibra de carbono estableciendo contacto eléctrico con el mismo, de tal forma que podemos acercar de forma precisa la fibra de carbono hasta las células cromafines (Figura 3.1B,C y Figura 3.2).

Hemos desarrollado un sistema de succión de fabricación casera (Figura 3.3A) que mediante una bomba de pecera, tubos Tygon® R3603, un matraz de 5 L de capacidad que sirve como depósito final y una pipeta de succión que está en íntimo contacto con la cámara donde depositamos las células, logramos eliminar el líquido sobrante proveniente de la perfusión a la que sometemos las mismas.

Una mesa antivibratoria TMC series 63-500 brindaba una superficie de trabajo libre de vibraciones. Estos sistemas actúan como filtros, amortiguando un alto porcentaje de la amplitud de aquellas vibraciones que llegan al sistema, con una eficacia de aislamiento de las vibraciones de 5 Hz de un 85 % en la vertical y de un 90 % en la horizontal. Hemos dispuesto nuestro equipo de amperometría y patch-clamp en el interior de una jaula de Faraday de fabricación casera realizada por SEGAINVEX; esta caja metálica protege de los campos eléctricos estáticos, en el interior de la caja no hay campos eléctricos no deseables y ninguna carga puede atravesarla, protegiendo a nuestros dispositivos (microscopio electrónico, amperómetro, micromanipuladores) de cargas eléctricas exteriores (fenómeno de apantallamiento eléctrico).

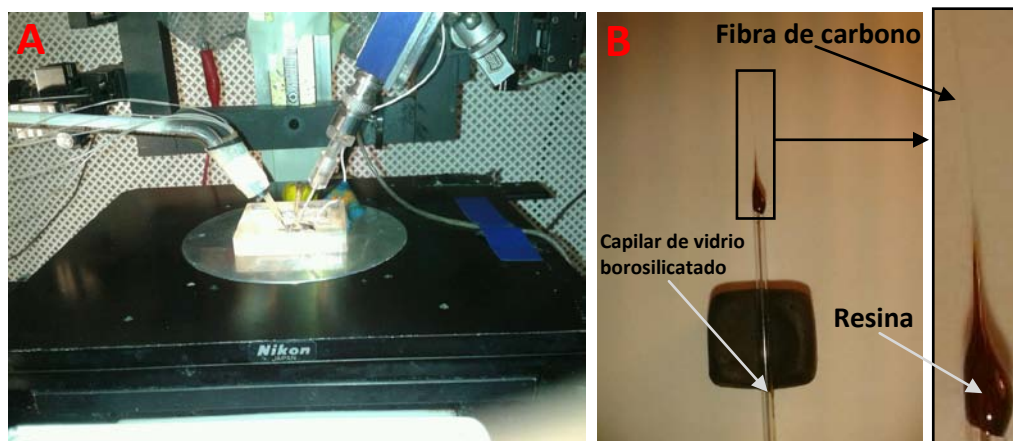


Figura 3.3- Algunos de los componentes utilizados en la técnica de amperometría. A.- Imagen de parte del equipo de amperometría utilizado con la pipeta de perfusión a la izquierda y el voltámetro a la derecha con el electrodo de fibra de carbono que se sumerge en la solución de la cámara central, donde colocamos el cubreobjetos con las células cromafines. Sobre la cámara, en la parte posterior, puede verse la pipeta de succión. B.- Imagen de un electrodo de fibra de carbono (electrodo o pipeta de amperometría) fabricada a partir del estiramiento de un capilar de vidrio borosilicatado. En la imagen ampliada de la derecha puede observarse la resina en color oscuro y como sobresale la fibra de carbono. Imágenes propias de los equipos e instrumentos (L1, ITH).

El voltámetro usado era de elaboración casera (fabricado en los talleres SEGAINVEX de la Universidad Autónoma de Madrid) y se conectó a una interfase (PowerLab/4SP ADInstruments, Nueva Zelanda) que digitalizaba la señal a 10 KHz enviando esta a un ordenador Apple McIntosh Power PC para visualizarse finalmente con el software Chart V. 4.2 (ADInstruments, Nueva Zelanda). Hemos aplicado un potencial de 730 mV al microelectrodo de fibra de carbono o electrodo de trabajo (Fig. 3.2), que hace las veces de electrodo de estimulación y de detección, con respecto a un electrodo de tierra de AgCl (electrodo de referencia). Como se citó anteriormente, los electrodos de fibra de carbono fueron pulidos y calibrados siguiendo las buenas prácticas amperométricas descritas en el trabajo de Machado y col. (2008); mediante la perfusión de 50 $\mu\text{mol/L}$ de noradrenalina disuelta en solución estándar de Tyrode; se realizaron medidas de la corriente obtenida para comprobar la funcionalidad y sensibilidad de los mismos; solo los electrodos que superaban los 200 pA de corriente y registraban menos de 400 pA se consideraban como válidos.

4.3.4 Análisis de los parámetros amperométricos de número de espigas, carga amperométrica total acumulada y de los parámetros cinéticos de espiga única

La carga amperométrica total se calculó por integración de la señal de corriente amperométrica sobre un estímulo de 10 s de duración en el caso de la mayoría de experimentos o de 60 s en el caso de los experimentos de hipoxia; esto se realizó mediante una macro escrita en el software Igor Pro (Wavemetrics, Oregon). El número de espigas se contó manualmente en una representación gráfica extendida en la pantalla de la computadora. Se trazó una línea a 10 pA por encima del valor medio del registro basal con ayuda de la macro y sólo se consideraron las espigas más grandes de 10 pA de amplitud.

El análisis de espiga única se llevó a cabo gracias a otra macro compatible con el software Igor Pro (Wavemetrics, Oregon) amablemente hecha pública y disponible por el laboratorio del Dr. Sulzer, del Departamento de Neurología y Psiquiatría de la Universidad de Columbia, Nueva York, EEUU (escrita por Eugene V. Mosharov, <http://www.sulzerlab.org/download.html>).

Los registros se filtraron digitalmente utilizando el software Igor Pro (Wavemetrics, Oregon) mediante un filtro Gaussiano de 1 KHz. Las espigas únicas mayores de 5 pA de amplitud fueron detectadas por la macro y mostradas en la pantalla de la computadora; éstas se examinaron visualmente una a una. La macro calcula automáticamente los parámetros cinéticos; hay espigas que bien por solapamiento entre ellas mismas (espigas múltiples) o bien por presentar un ruido excesivo, la macro no es capaz de ajustar sus parámetros internos a los trazos de ascenso y descenso de la espiga amperométrica, dando unos datos aberrantes; de ahí que tengamos que ir visualizando las espigas una a una y descartando aquellas donde la macro no ha realizado un buen ajuste. Hemos tomado todos los tiempos en los que hemos encontrado espigas múltiples para realizar un análisis posterior de este dato.

Los parámetros cinéticos analizados de la espiga única fueron los siguientes (Figura 3.4, derecha): I_{\max} = amplitud de la espiga (pA); $t_{1/2}$ = anchura de la espiga en la amplitud media (ms); Q = carga amperométrica o tamaño cuantitativo de la espiga (pC);

VA= velocidad de ascenso de la espiga (pA/ms); t_{c75-25} = tiempo de caída de la espiga desde el 75% de la amplitud máxima hasta el 25%. Los parámetros cinéticos analizados de los pies de cada una de las espigas que los presentaban fueron estos (Figura 3.4, izquierda): $I_{pie\ espiga}$ = amplitud del pie la espiga (pA); $T_{pie\ espiga}$ = tiempo total que se extiende el pie de la espiga (ms); $Q_{pie\ espiga}$ = carga amperométrica total contenida en el pie de la espiga.

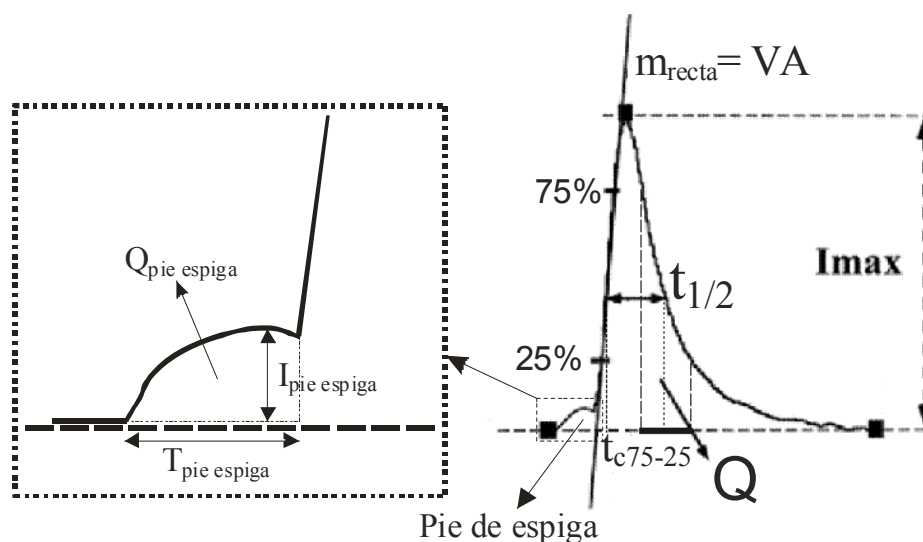


Figura 3.4- Representación de una espiga amperométrica aislada que presenta un pie de espiga en su parte inicial. Se representan en la derecha de la figura los parámetros cinéticos de la espiga; obsérvese como la velocidad de ascenso de la espiga (VA) viene definida por la pendiente de la recta (m_{recta}), la I_{max} viene representada por las flechas discontinuas como la distancia desde la línea basal hasta el punto de corriente máximo alcanzado por la espiga, la $t_{1/2}$ la limitan las flechas continuas y viene definida como la anchura de la espiga donde la amplitud de la misma es del 50% de su valor máximo; el parámetro Q viene a representar la carga amperométrica total contenida por la espiga como resultado de integrar todo el área que se encuentra bajo el trazo de la espiga; por último el t_{c75-25} , tiempo de caída de la espiga desde el 75% de la amplitud máxima hasta el 25% aparece marcado en el eje horizontal de tiempo como una barra negra continua. El pie inicial de la espiga se muestra ampliado en la parte izquierda de la figura y en el esquema aparecen marcados por flechas continuas los parámetros estudiados: $I_{pie\ espiga}$, $T_{pie\ espiga}$ y $Q_{pie\ espiga}$. Esta figura se ha realizado incorporando modificaciones propias a la Fig. 3 presente en el trabajo de Gómez y col. (2002).

La media para cada parámetro de todas las espigas amperométricas se calculó célula a célula; los tests para encontrar las diferencias estadísticas entre los grupos se realizaron utilizando estas medias, es decir se obtuvo un valor medio de cada parámetro cinético por cada una de las células; éste es el método más sólido para las comparaciones estadísticas realizadas con los datos amperométricos de espiga única (Colliver y col., (2000); Mosharov y Sulzer, 2005). Los datos son representados como diagramas de “*caja y bigotes*”, la línea interior de la caja representa el valor de la mediana, el tamaño de la caja viene dada por la distancia entre los percentiles 25 y 75, el “*bigote*” superior alcanza hasta el percentil 90 y el “*bigote*” inferior, el percentil 10. Los diagramas de “*caja y bigotes*” son una manera muy informativa de presentar los datos ya que dan una idea más precisa de la dispersión de la muestra con los percentiles 10, 25, 75, 90 y el valor de la mediana. La media \pm error estándar (e.e.) también se ha indicado en todo el texto y en las leyendas de las figuras.

Se comprobó la normalidad de los conjuntos de datos (test de normalidad de *Kolmogorov-Smirnov*), como requisito previo para la aplicación del test de la *t de Student* o del test *ANOVA* (Analysis of variance). Hemos encontrado que bastantes de los grupos no se ajustan bien a una distribución normal, por lo tanto se usaron dos test estadísticos no paramétricos, el test de *Mann-Whitney* para comparar dos grupos de datos o el test de *medidas repetidas Kruskal-Wallis* para más de dos grupos; en el caso de encontrarse diferencias significativas en este último test, las comparaciones múltiples se realizaron con el *test de Dunn*, para determinar cuáles de los grupos eran estadísticamente diferentes.

En algunos grupos de datos se utilizaron los test paramétricos; test de la *t de Student* o una *ANOVA* con *Bonferroni*; y se han comparado los resultados con los de los test no paramétricos. Ambos test producen resultados similares. Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa de análisis estadístico SPSS 13 (SPSS inc. Chicago, Illinois) y Microsoft Excel (Corporación Microsoft, Redmond, Washington). Se tomó un p-valor igual o menor de 0.05 como el límite de significación.

4.4 Medida en tiempo real de la liberación de catecolaminas mediante la técnica de amperometría en poblaciones de células cromafines bovinas

Las células, que para los experimentos de secreción en poblaciones habían sido sembradas en placas Petri de 60 mm de diámetro a una densidad de 10^6 células/ml (5 ml por placa), se separaron cuidadosamente de la placa Petri con una espátula de goma y fueron centrifugadas durante 10 min a 800 rpm. El sedimento se resuspendió en 200 μ l de Krebs-Hepes (composición en mM: 144 NaCl, 5.9 KCl, 1.2 $MgCl_2$, 11 glucosa, 10 Hepes; pH 7.4) con 0 ó 2 mM $CaCl_2$ según se requiriese. Se alojó a las células en una microcámara de 100 μ l y se perfundieron las soluciones del experimento a una velocidad de 2 ml/min. El líquido que salía de la cámara de perfusión se dirigía a un detector electroquímico modelo 641 VA (Metrohm; Herisau, Suiza) colocado al lado de la cámara y que monitorizaba a tiempo real y en su modo de medida amperométrica la cantidad de catecolaminas secretadas (Borges y col., 1986).

Se estimularon las células con pulsos cortos (2 ó 5 s dependiendo de los diferentes protocolos experimentales utilizados en los distintos trabajos) aplicados cada 1 ó 2 minutos de intervalo de tiempo entre ellos. Para la estimulación se utilizó una solución de Krebs-Hepes que contenía 75 ó 100 mM K^+ mediante una sustitución isoosmótica de NaCl por KCl. Esta estrategia amperométrica permite realizar registros a tiempo real de respuestas reproducibles de catecolaminas secretadas durante largos periodos de tiempo (30 a 60 min). Las soluciones se intercambiaron rápidamente a través de electroválvulas controladas por un ordenador. La gran mayoría de los experimentos de secreción se realizaron a 37 °C, temperatura que se alcanzó sumergiendo las soluciones de perfusión en un baño termostático e introduciendo la camarita de perfusión en una camisa termostatizadora, salvo los experimentos realizados a temperatura ambiente (22 °C) donde estos últimos procedimientos no se llevaron a cabo.

4.5 Registro de corrientes iónicas mediante la técnica de patch-clamp

4.5.1 Generalidades

Las corrientes iónicas de calcio (I_{Ca}), sodio (I_{Na}) o potasio (I_K) generadas por la estimulación de una célula mediante la aplicación de estímulos despolarizantes se registraron mediante la técnica de *patch-clamp* (Hamill y col., 1981) en su modalidad de fijación de voltaje y bajo la configuración de célula entera o de parche perforado (Korn y Horn, 1989; Gillis y col., 1991).

La técnica de *patch-clamp* en su **modalidad de fijación de voltaje** consiste en mantener fija la diferencia de potencial de un parche de membrana plasmática de la célula con ayuda de un amplificador. De este modo, si en respuesta a un determinado estímulo se produce alguna corriente de entrada o de salida de iones a través de los canales iónicos y/o receptores presentes en el parche de membrana de dicha célula, la medición de la corriente que es necesario inyectar para mantener fijo el potencial de membrana (V_m) será equivalente al flujo de iones que se ha movilizado a través de la membrana de la célula.

Esta técnica emplea un único electrodo que simultanea a elevada frecuencia el registro de voltaje (para mantenerlo fijo a lo largo del parche de membrana plasmática) y el registro de corriente (que ha de ser inyectada para mantener fijo el V_m). Sus ventajas con respecto a la técnica clásica de fijación de voltaje de doble electrodo (Marmont, 1949; Hodgkin y col., 1952) son que se puede aplicar a células pequeñas, en las que sería imposible introducir dos electrodos, y que presenta una buena relación señal-ruido, por lo que permite el registro del orden de pA.

Este método de fijación de voltaje (*voltage clamp*) nos permite controlar el potencial de membrana y medir las corrientes que pasan por los canales iónicos (Hodgkin y Huxley, 1952). La aplicación de esta técnica implica la introducción de al menos un microelectrodo que esté en contacto con el medio intracelular y la presencia de un electrodo de referencia en contacto con el medio extracelular. Si bien se han desarrollado diferentes alternativas para lograr poner en contacto un electrodo con el

citosol, la técnica desarrollada en los años 70 por Neher y Sakmann (Neher y Sakmann, 1976) y conocida como *patch-clamp* es hoy en día la técnica más elegida para trabajar con la mayoría de los tipos celulares. Si bien existen distintas configuraciones de esta técnica, el punto común a todas ellas es la formación de un sello de alta resistencia entre el electrodo de registro formado por una pipeta de vidrio de alrededor de 1 μm de diámetro en su punta, y el parche de membrana celular.

La resistencia del sello es de crítica importancia, ya que influye marcadamente en el ruido eléctrico presente en la medición. El microelectrodo queda conformado por el conjunto de la micropipeta a la cual introducimos una solución electrolítica compuesta por los iones mayoritarios contenidos en el citosol a similares concentraciones (solución intracelular) y un alambre de plata clorurado. Para formar el sello, el primer paso es apoyar la pipeta sobre la superficie de la célula; para ello la pipeta de vidrio se aproxima a la membrana de la célula y se presiona contra ella, de forma que se genera un sello eléctrico de alta resistencia (de unos 50 $\text{M}\Omega$) que asegura que la mayoría de corrientes originadas en el parche de membrana fluyan hacia el interior de la pipeta y de allí al circuito de medida de la corriente.

Si la punta de la pipeta de vidrio se mantiene limpia y pulida en su superficie, la aplicación de un ligero pulso de succión o presión negativa en su interior permite conseguir sellos de alta resistencia, mayores a 1 $\text{G}\Omega$ y del orden de 10-100 $\text{G}\Omega$; conocidos como *giga-sellos*; estos sellos reducen el ruido del registro y evitan el flujo de corriente entre la pipeta y el baño (corriente de fuga), lo que permite fijar el potencial de membrana. Para lograr un buen *giga-sello* es necesario que las puntas de las pipetas estén bien limpias y pulidas.

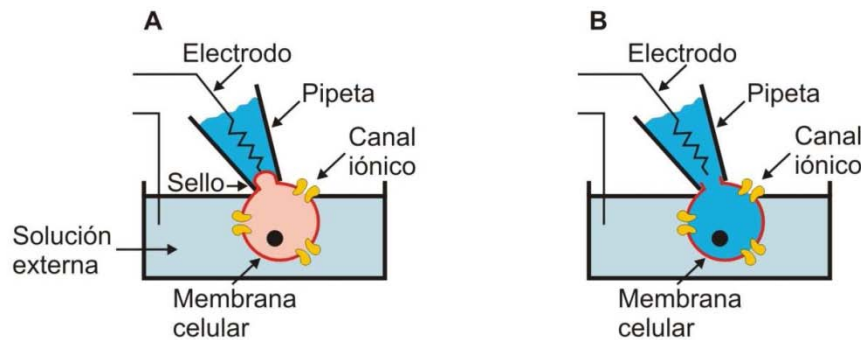


Figura 4.1- Esquema representativo de la formación de un giga-sello. A.- La pipeta se apoya sobre la superficie de la membrana y con aplicar una leve presión negativa parte de la membrana celular ingresa hacia el interior de la pipeta de patch y se forma el sello (configuración *cell attached*). **B.-** Una vez que se aplica un corto pero intenso pulso de succión o presión negativa se consigue romper la sección de membrana celular que queda dentro de la pipeta y la solución intracelular contenida en la pipeta invade el interior celular (configuración de *célula entera* o *whole cell*).

A la configuración obtenida una vez formado el giga-sello entre la pipeta y la membrana se la denomina célula adherida o parche *in situ* (*cell attached*) (Figura 4.1A). Esta configuración, permite medir la actividad de los pocos canales situados en el parche de la membrana que quedaron dentro de la punta de la pipeta con la célula intacta. Estos sellos son además mecánicamente muy estables, por lo que permiten diversas manipulaciones mecánicas que originarán las distintas configuraciones de la técnica (*célula adherida*, *célula entera*, *parche perforado*, *parche escindido dentro-fuera* y *parche escindido fuera-fuera*). Al retirar rápidamente la pipeta de la célula, llevándose el sello, la sección de membrana intracelular quedaría expuesta a la solución externa. Esta configuración permite evaluar la actividad de los canales y su regulación por factores que actúen del lado intracelular y se la denomina *parche escindido dentro-fuera* o *inside-out patch*.

Una tercera configuración, la llamada *célula entera* o *whole cell*, es la que se utiliza para medir a un nivel celular global tanto las corrientes iónicas de membrana, como los cambios del potencial de membrana (en la modalidad de fijación de corriente o *current clamp*), además de los cambios de capacidad de la membrana celular. Los cambios de capacidad están directamente relacionados con las actividades exocitóticas y endocitóticas de la célula. Para obtener esta configuración, que se aplica en una parte de

experimentos de este trabajo de tesis, una vez obtenida la configuración de *célula adherida* o parche *in situ* (*cell attached*) se mantiene la membrana celular en el potencial de fijación o *holding potential* (que en nuestro caso y tratándose de células cromafines hemos establecido en -80 mV) y a continuación se aplica un corto pero intenso pulso de succión o presión negativa hasta romper la sección de membrana que queda dentro de la pipeta (Figura 4.3B).

Cuando dicha sección de membrana se rompe, el electrodo de *patch-clamp* forma un circuito continuo con el interior de la célula. Entonces, frente a la aplicación de un pulso cuadrado de voltaje se observa una respuesta capacitiva transitoria por el aporte de membrana celular al circuito procedente de las vesículas exocitóticas que se fusionan y el incremento consiguiente de la capacitancia, ya que la membrana celular funciona como un condensador. En la configuración de *célula entera* la solución incluida en la pipeta de *patch-clamp* ingresa al interior de la célula reemplazando a la solución interna fisiológica (Figura 4.3B). Debido a ello, esta solución se prepara intentando simular las condiciones intracelulares, pero introduciendo las modificaciones que sean convenientes a cada serie experimental.

Por medio del microelectrodo de *patch-clamp* se controla el potencial del lado interior de la membrana plasmática (V_{intra}), mientras que el lado exterior de la membrana estará expuesto al potencial del baño en el que se encuentra la célula y en conexión con el electrodo del baño (V_{extra}). Si se fija una diferencia de potencial de -80 mV entre los medios extracelular e intracelular ($V_{intra}-V_{extra}$), la membrana plasmática estará en condiciones similares al reposo, no habiendo flujo neto de iones a su través. Pero si se imponen potenciales más positivos, que superen cierto valor umbral, se activarán canales dependientes del voltaje como los canales de Ca^{2+} , Na^{+} o K^{+} dependientes de voltaje.

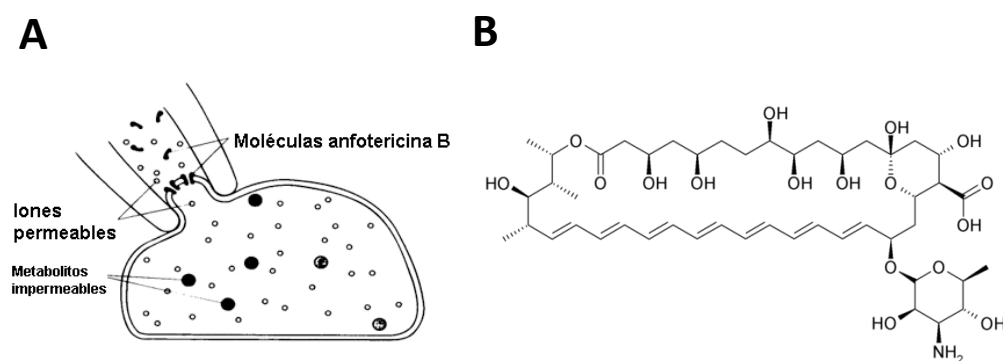


Figura 4.2- Representación de la configuración de “*parche perforado*” (*perforated patch*) de la técnica de patch-clamp. A.- La pipeta se apoya sobre la superficie de la membrana y con aplicar una leve presión negativa parte de la membrana celular ingresa hacia el interior de la pipeta de patch y se forma el sello (configuración *cell attached*); Una vez que se ha formado el sello se deja actuar a un agente permeabilizante de la membrana plasmática (*anfotericina B*); las moléculas de *anfotericina B* forman poros en la parte de la membrana plasmática atrapada bajo la punta de la pipeta de patch y que está en contacto con la solución intracelular de la pipeta; por estos poros pueden pasar determinados iones permeables que logran establecer una continuidad eléctrica entre el interior de la célula y la solución de la pipeta de patch, mientras que el resto de metabolitos celulares no pueden permear por estos poros manteniendo la integridad del contenido citoplasmático. **B.-** Estructura química de la *anfotericina B* con la cadena de dobles enlaces, la hexosamina y el ácido carboxílico.

Una variación de la configuración de *célula adherida* o *parche in situ* (*cell attached*) es el llamado “*parche perforado*” (*perforated patch*). Esta configuración (Korn y Horn, 1989) se obtiene por la inclusión de un agente permeabilizante de la membrana plasmática en la solución de la pipeta de *patch*; en nuestro caso hemos utilizado el antifúngico *anfotericina B* (Figura 4.2AB); los antifúngicos forman poros en el parche de membrana que queda atrapado bajo la punta de la pipeta y permiten así el acceso eléctrico al interior celular (Figura 4.2A). Para conseguir la configuración de parche perforado se parte de una célula adherida y se espera a que el antifúngico forme los poros en la membrana sin aplicar pulso de succión o presión negativa cuando esto ha sucedido. Los antifúngicos forman poros en las membranas celulares que contienen colesterol o ergosterol que van a ser permeables a cationes monovalentes y a Cl^- (hasta 9 veces más permeables a cationes monovalentes que al Cl^-) e impermeables a iones multivalentes (Figura 4.2A) como el Ca^{2+} o el Mg^{2+} y a moléculas no electrolíticas de tamaño igual o superior a la glucosa.

La anfotericina posee propiedades antibióticas y antifúngicas, se aisló por vez primera en 1955 de los productos de secreción de la bacteria filamentosa gram positiva *Streptomyces nodosus* que había sido recogida en unas muestras de suelo presentes en el río Orinoco, concretamente en la región de Venezuela. La anfotericina presenta una constitución química compleja, formada por una cadena de 7 dobles enlaces (heptaeno) que se une a una hexosamina (micosamina), además presenta dos grupos carboxilo unidos a la cadena de dobles enlaces (grupos ácidos) y una amina primaria (grupo básico) (Figura 4.2B). Es una molécula muy poco soluble, no se disuelve en agua ni en disolventes orgánicos con facilidad. Esta molécula presenta dos formas químicas, la *anfotericina A*, que carece de utilidad clínica y la *anfotericina B* que es la que hemos usado en nuestros experimentos de “parche perforado”.

Otro antibiótico utilizado como agente permeabilizante en la configuración de “*parche perforado*” es la nistatina, que se aísla de otra especie del género *Streptomyces* (*Streptomyces noursei*) y aunque ambos antibióticos tienen una estructura química y propiedades cualitativas similares, presentan diferencias cuantitativas relevantes: La nistatina es menos potente como agente permeabilizante a bajos rangos de concentración de antibiótico (Cass y col., 1970), hay una mayor dependencia por parte de la nistatina de la talla del ión para que consiga una permeabilidad dada (De Kruijff y col., 1974) y los poros que genera la nistatina en la membrana tienen una conductancia de canal único más baja que los poros generados para la *anfotericina B* Ermishkin y col., 1976).

4.5.2 Procedimiento

Gran parte de los experimentos presentados en esta Tesis se realizaron principalmente mediante la configuración de parche perforado, ya que es menos invasiva (se evita la succión para romper el parche de la membrana) y presenta un sello y resistencia de acceso al interior celular mucho más estables. Además, el parche perforado permite obtener registros de hasta 1 h de duración en una misma célula, resultando de especial utilidad para estudiar procesos celulares que sean dependientes de componentes intracelulares pues estos no sufren un proceso de “lavado” o diálisis.

Sin embargo, la configuración de parche perforado presenta la desventaja de no permitir el control de la composición intracelular por parte del investigador.

Las pipetas de registro empleadas se fabricaron a partir de capilares de vidrio borosilicatado gracias a un estirador de pipetas (Narishige PC-10®, Tokio, Japón), quedando por cada capilar de vidrio dos pipetas individuales; este estirador aplica dos calores consecutivos al capilar de vidrio durante unos segundos; los valores de estos calores determinarán el diámetro de la pipeta de patch en su extremo más fino así como la resistencia deseada de las mismas; los calores aplicados fueron de 69.7 °C para el primer calor y 48.0 °C para el segundo. A continuación la punta de las pipetas de patch debía de ser pulida con ayuda de una microforja (MF-830, Narishige, Tokio, Japón) aplicando varios pulsos rápidos de calor consecutivos inferiores a un segundo de duración y de 65 °C, de esta forma se obtenían unas resistencias de las pipetas de entre 2-5 MΩ.

Las pipetas de registro se sumergían brevemente (unos segundos) por la punta en la solución intracelular sin *anfotericina B* y a continuación se rellenaban por detrás con solución intracelular con *anfotericina B*. De este modo se podía conseguir la configuración de célula adherida antes de que el antifúngico hubiese difundido hacia la punta de la pipeta para comenzar a formar los poros en la membrana (lo que dificultaría la obtención del sello). La anfotericina, que se preparaba nueva cada día, se añadía a partir de una solución madre de *anfotericina B* disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO), a la concentración de 50 mg/ml, sonicándola hasta su completa solubilización protegida de la luz.

La concentración final de *anfotericina B* se obtenía añadiendo 10 µl de esta solución madre a 1 ml de solución intracelular y sonicándola de nuevo protegida de la luz y del calentamiento hasta su completa homogeneización; esta solución se mantenía en frío, se agitaba con frecuencia en el vortex para evitar la deposición y se utilizaba en el plazo máximo de unas 3 h para asegurarse de que no hay pérdida de la actividad antifúngica. El proceso de perforación de la membrana plasmática por la *anfotericina B* se alargaba entre 5-15 min hasta alcanzar una resistencia en serie <20 MΩ. Pasado este

tiempo la resistencia en serie debía ser de no más de 30 $M\Omega$ para que comenzásemos a realizar el experimento sobre esa célula.

Para la estimulación celular y la adquisición de datos se empleó el programa PULSE (HEKA Electronics, Chester, Canada) y un ordenador PC. Los registros se adquirieron con una frecuencia de muestreo de 5-10 KHz y se filtraron a 1-2 kHz. Los registros con una corriente de fuga superior a 50 pA se descartaron.

Las soluciones extracelulares que se perfunden a las células se intercambiaban mediante el mismo sistema de perfusión rápida descrito anteriormente para la amperometría; en este caso la punta de la pipeta de perfusión se posicionaba a menos de 100 μm de la célula en experimentación y el fluido corre por efecto de la gravedad con una velocidad de flujo de 0.5 ml/min hasta cada una de las cinco vías de la pipeta de perfusión, lo que permite el completo recambio de las soluciones experimentales en unos 50 ms. El análisis de las corrientes se llevó a cabo mediante los programas IgorPro (Wavemetrics Inc., Oregon, USA) y PULSE.

4.5.3 Medida de la exocitosis mediante el estudio de la variación de la capacidad eléctrica de la membrana celular (ΔC_m)

La medida de la capacidad eléctrica de la membrana celular nos proporciona de forma indirecta la medida de la secreción (exocitosis) y retirada de membrana (endocitosis) debido a la propiedad de la membrana celular de actuar como un condensador. De esta forma podemos registrar cambios en el tamaño de la superficie celular al producirse la exocitosis, ya que la membrana de las vesículas pasa a formar parte de la membrana plasmática, lo que conlleva un incremento en la superficie de la misma. Tras el proceso exocitótico se puede observar una caída del registro de la capacidad de la membrana, indicándonos la existencia de un proceso endocitótico.

Para estimar estos cambios, utilizamos la técnica desarrollada por Lindau y Neher (Lindau y Neher, 1988), basado en la aplicación de una onda sinusoidal de voltaje a la membrana celular (1 kHz, 60 mV de amplitud), para lo que hemos utilizado también el amplificador de patch-clamp. Utilizando la técnica de *patch clamp* en la

modalidad de *fijación de voltaje* (*voltage clamp*), además de las corrientes iónicas que atraviesan la membrana pueden medirse otros parámetros eléctricos, como la capacitancia o capacidad de la membrana.

La resolución que tiene esta técnica para medir cambios de capacitancia puede llegar al orden del femtofaradio (10^{-15} F) en condiciones experimentales óptimas, permitiendo detectar la fusión de vesículas aisladas. Además, posee una resolución temporal del orden de milisegundos (ms). La desventaja de esta técnica como medida de la exocitosis es que se mide el cambio total de superficie celular, el que puede resultar de un proceso de exocitosis, de endocitosis o de ambos combinados si ocurriesen simultáneamente. En este último caso se estaría midiendo la diferencia entre estos dos procesos, sin poder definir el valor de uno u otro. Sin embargo la endocitosis suele ser mucho más lenta (> 1 seg) que la exocitosis (pocos ms), con lo cual para estímulos breves la exocitosis y la endocitosis pueden ser separadas cinéticamente (Gillis y Misler, 1992).

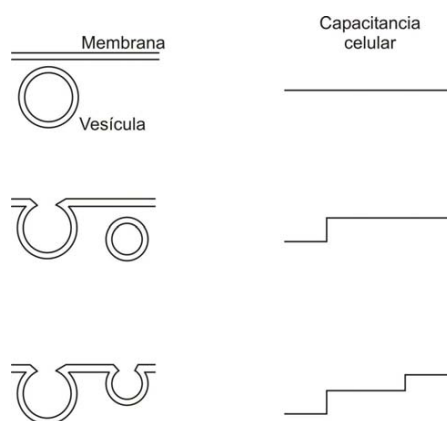


Figura 4.3- Una herramienta para cuantificar la exocitosis a través de la medida de la capacidad eléctrica de la membrana celular. Conforme se estimula a la célula con pulsos despolarizantes sucesivos se observa un aumento en la capacidad eléctrica de la membrana celular como consecuencia de la fusión de la membrana de las vesículas con la membrana plasmática. En las células cromafines se estimó que el tamaño de una vesícula es de 1,3 fF (Moser y Neher, 1997).

La configuración de célula entera (*whole cell*) permite cuantificar el número de las vesículas que se fusionan en cualquier punto de la membrana celular (exocitosis) a través de la medición de su capacidad. A medida que se estimula a la célula con pulsos

despolarizantes cortos que provocan la activación de corrientes de Ca^{2+} , se observa un aumento en la capacidad celular como consecuencia de la fusión de las vesículas con la membrana plasmática (Figura 4.3) (Neher y Marty, 1982).

4.5.4 Metodología para el estudio de los diferentes contingentes de vesículas cromafines

4.5.4.1 **Protocolo de doble pulso o de pulsos pareados**

El protocolo de doble pulso despolarizante o de pulsos cuadrados pareados se utilizó para la cuantificación de los distintos *contingentes de vesículas* (Figura 2.6 y 2.7 de la Introducción). El grado de exocitosis secuencial de los diferentes *contingentes vesiculares* que pueden ser liberados de las células cromafines será dependiente de la intensidad de estimulación. Un protocolo de doble pulso despolarizante, ya validado por la literatura (Gillis y col., 1996) fue utilizado para cuantificar los tamaños del *contingente de vesículas* inmediatamente liberables (IRP; *immediately releasable pool*) y del *contingente de vesículas* que se encuentran preparadas para liberarse (RRP, *ready releasable pool*).

Este protocolo consta de dos pulsos despolarizantes cuadrados de la misma duración y sometidos al mismo potencial, separados por un tiempo fijo (Figura 4.4). La duración de los pulsos se debe modificar dependiendo del *contingente de vesículas* que se quiere cuantificar. Este protocolo permite, mediante un modelo muy sencillo, que utiliza los incrementos en la capacidad de membrana celular asociados a estos pulsos, acotar el tamaño del *contingente de vesículas* en cuestión entre un valor máximo (B_{max}) y uno mínimo (B_{min}) (Gillis y col., 1996; Voets y col., 1999).

Este modelo se basa en la existencia de un *contingente de vesículas* de tamaño B_0 , del que se fusiona una fracción α_1 , que es mayor del 50% del total con el primer pulso. En consecuencia, el primer pulso produce un cambio de capacidad de membrana que viene dado por $\Delta C_{m1} = \alpha_1 B_0$ (Figura 4.4).

Suponiendo que no hay relleno del *contingente de vesículas* B_o entre estímulos por la movilización de vesículas de otros grupos vesiculares situados río arriba en la cadena de movilizado vesicular, el segundo pulso libera una proporción α_2 del resto de vesículas cromafines que quedan, es decir:

$$(1.1)$$

$$\Delta C_{m2} = \alpha_2 (B_o - \Delta C_{m1}) = \alpha_2 (1 - \alpha_1) B_o$$

Vamos a asumir que $\alpha C_{m2} < \alpha C_{m1}$, es decir que el primer salto de capacidad generó una exocitosis suficiente como para agotar parcialmente el contingente vesicular (Fig. 4.4). Podemos llegar a expresar el tamaño del *contingente vesicular* (B_o) en función de los incrementos de capacidad de membrana (αC_{m1} y αC_{m2}) y de las proporciones de vesículas liberadas (α_1 y α_2) con la siguiente fórmula (1.2); donde $S = \Delta C_{m1} + \Delta C_{m2}$ y $R = \Delta C_{m2} / \Delta C_{m1}$

$$(1.2)$$

$$B_o = \frac{S}{(1 - \frac{\alpha_1}{\alpha_2} R)(1 + R)}$$

Podemos presuponer que en ambas despolarizaciones se induce la misma entrada de calcio y que cada pulso libera la misma fracción ($\alpha_1 = \alpha_2$); entonces el valor del tamaño del *contingente vesicular* se podría calcular exactamente por la ecuación (1.3). Sin embargo esta suposición puede no ser cierta en algunos de los casos, ya que puede mantenerse en el citosol una cierta cantidad de calcio residual tras el primer pulso, provocando que la fracción liberada en el segundo pulso pueda ser mayor que en el primero, es decir $\alpha_2 > \alpha_1$. En este caso, la ecuación (1.3) estaría sobreestimando el valor real; por esta razón se considera a este valor un límite superior del *contingente vesicular* evaluado y se le denomina $B_{m\acute{a}x}$.

(1.3)

$$B_{m\acute{a}x} = \frac{\Delta C_{m1} + \Delta C_{m2}}{1 - \left(\frac{\Delta C_{m2}}{\Delta C_{m1}} \right)^2}$$

Por otro lado, el valor mínimo que puede tomar el tamaño del *contingente vesicular*, Bmin es la simple suma de los cambios en capacidad de membrana provocados por ambos pulsos despolarizantes (1.4).

(1.4)

$$B_{min} = \Delta C_{m1} + \Delta C_{m2}$$

La aplicación de este protocolo para estimar el IRP consiste en dos pulsos despolarizantes de 10 ms de duración separados por 100 ms. Mientras que para el RRP los pulsos son de 100 ms con la misma separación (Figura 4.4). El tiempo entre pulsos de 100 ms fue establecido de forma que se puede garantizar que en este corto intervalo de tiempo sea mínimo el rellenado del *contingente vesicular* por la movilización de vesículas de otros grupos vesiculares (Gillis y col., 1996). Para que la estimación de los tamaños de los *contingentes vesiculares* sea exacta es necesario que el ΔC_{m1} sea mayor que ΔC_{m2} , o lo que es lo mismo, que R sea menor a 1 (Figura 4.4). Esto daría una idea del agotamiento del *contingente vesicular* tras el primer pulso despolarizante, que es lo que sucede más frecuentemente en la realidad.

En el cómputo de los datos para obtener las medias experimentales se utilizaron sólo los experimentos en los que se cumple que R es menor a 0,7. Hay que observar también que las corrientes de calcio generadas por ambos pulsos despolarizantes son de amplitud similar (Figura 4.4), ya que de no ser así puede llevar a una mala interpretación del modelo, si la corriente de calcio del segundo pulso despolarizante es significativamente menor que la del primero, el menor salto de capacidad observado tras

el segundo pulso despolarizante puede no deberse a un agotamiento del *contingente vesicular* sino a que el calcio que ha entrado por CCDV ha sido menor.

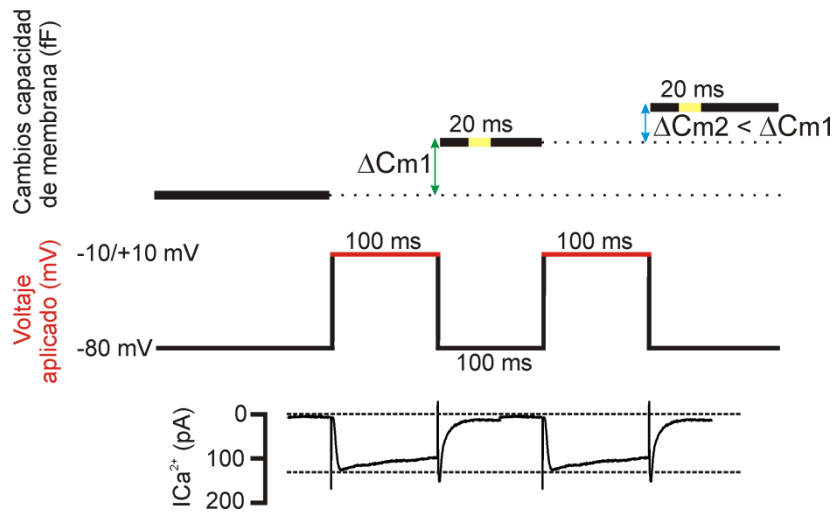


Figura 4.4- Esquema del protocolo de doble pulso o de pulsos pareados utilizado para la estimación del RRP. El protocolo aplicado consta de dos pulsos despolarizantes cuadrados de 100 ms de duración, separados entre sí por 100 ms, cuya despolarización abarca desde el potencial de fijación de -80 mV hasta el punto en el que se alcanza el máximo de corriente de Ca^{2+} en cada célula cromafín ($-10/+10$ mV). Según este modelo, frente a similares entradas de calcio (como puede verse en las dos I_{Ca} representadas en la parte inferior del esquema), la respuesta en el incremento de la capacidad de membrana del segundo pulso (ΔC_{m2}) ha de ser menor que la del primero (ΔC_{m1}) debido a que se produce un agotamiento del RRP. De cada uno de los saltos de capacidad de membrana se obviaron los primeros 25 ms del registro y se utilizó para el cálculo de los datos una media de los 20 ms siguientes (trazo en amarillo). Para realizar la estimación del IRP se utilizó el mismo protocolo con la única diferencia que la duración de los pulsos despolarizantes se acorta a tan solo 10 ms.

4.5.4.2 Procedimiento

Para estimar la talla del *contingente de vesículas* que se encuentran preparadas para liberarse (RRP, *ready releasable pool*) —Figura 2.6 de la introducción— hemos aplicado el siguiente protocolo; se han estimulado las células cromafines embrionarias y de rata madre con dos pulsos despolarizantes consecutivos de 100 ms de duración y separados entre sí otros 100 ms (Figura 4.4); utilizando la técnica de patch-clamp en la configuración de parche perforado y 5 mM de Ca^{2+} extracelular como agente de carga. El valor de la despolarización a aplicar fue ajustado en cada célula teniendo en cuenta el voltaje donde encontrábamos la amplitud máxima de corriente de calcio que cada célula

poseía; para ello inicialmente cada célula fue sometida a un protocolo de rampa y el voltaje al que alcanzábamos el pico máximo de corriente de Ca^{2+} fue interpretado como el valor indicado para los pulsos despolarizantes —valor que solía encontrarse entre los -10 mV y +10 mV— —Figura 4.4—.

Los incrementos en la capacidad de membrana plasmática (ΔCm) producidos fueron sustraídos de los registros similares obtenidos en presencia de Cd^{2+} a fin de eliminar en la medida de lo posible el artefacto de incremento de capacidad de membrana producido por la apertura de canales de Na^+ (Horrigan y Bookman, 1994). Los ΔCm se calcularon substrayendo la media del tramo de 20 ms de capacidad de membrana justo después de los 25 ms iniciales del salto de capacidad que se produce tras el pulso despolarizante (Figura 4.4). Las estimaciones del *contingente de vesículas inmediatamente liberables* (IRP; *immediately releasable pool*) (Figura 2.6 y Figura 2.7 de la introducción) fueron obtenidas reduciendo el tiempo de los pulsos despolarizantes a tan solo 10 ms. Hemos calculado los parámetros B_{\min} y B_{\max} conforme es descrito por Gillis y col. (1996) los cuales establecen unos valores mínimos y máximos para la talla de un determinado contingente de vesículas.

4.6 Medidas de los cambios de la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$)

4.6.1 Generalidades

A lo largo de todo el trabajo realizado en esta tesis se ha utilizado la técnica de microscopía de fluorescencia como herramienta para registrar los transientes de calcio citosólico en células cromafines. La microscopía de fluorescencia es una de las herramientas complemento fundamentales de Investigación en Biología Molecular y en Biotecnología. Sobre la base de un microscopio óptico, en el microscopio de Fluorescencia se utiliza luz monocromática irradiada comúnmente por un Laser (es aquella luz que está formada por componentes de un solo color, es decir que tienen una sola longitud de onda correspondiente al color); esta luz atraviesa un divisor selectivo de haz y el mismo objetivo, de forma que llega a excitar los estados electrónicos de ciertas especies moleculares presentes en la muestra. Estas especies moleculares tienen la virtud de perder la excitación emitiendo luz visible con una frecuencia característica.

La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y vuelven a emitir una luz secundaria con mayor longitud de onda. Para dejar pasar sólo la emisión secundaria deseada, se deben colocar filtros apropiados debajo del condensador y encima del objetivo. Esta técnica es utilizada para detectar sustancias con fluorescencia propia (por ejemplo la vitamina A) o sustancias marcadas con fluorocromos (parte activa de la sonda de fluorescencia). El fenómeno de la fluorescencia se produce cuando un electrón de un átomo absorbe toda la energía de una determinada longitud de onda de la luz, saltando a otros orbitales. Es una situación inestable durante la cual el electrón emite la mayor parte de la energía que ha absorbido (con mayor longitud de onda) y vuelve a desplazarse a su orbital. Aprovechando este fenómeno, se han desarrollado los diferentes fluorocromos o fluoróforos. Para utilizarlos necesitamos una lámpara fuente que emita luz ultravioleta y luz visible. Para excitar el fluorocromo necesitamos un filtro de excitación que seleccione la longitud de onda específica para dicho fluorocromo. Los fluorocromos más comúnmente utilizados son el DAPI que tiñe el núcleo de las células y la proteína fluorescente verde (GFP).

Los fluorocromos se organizan en diversas familias atendiendo a su naturaleza proteica (proteínas fluorescentes: GFP (verde), YFP (amarillo) y RFP (rojo)) o no proteica, que son fluoróforos orgánicos pertenecientes a las siguientes familias químicas importantes: 1) Derivados de xanteno (fluoresceína, rodamina); 2) Derivados de cianina (indocarbocianina, oxacarbocianina); 3) Derivados de naftaleno (prodan, dansilo); 4) Derivados de cumarina; 5) Derivados de oxadiazol; 6) Derivados de pireno; 7) Derivados de oxacina (rojo nilo, oxacina170); 8) Derivados de acridina (proflavina, naranja de acridina); 9) Derivados de arilmetilo (auramina, verde malaquita); 10) Derivados de tetrapirrol (porfina, bilirrubina).

Los fluoróforos pueden utilizarse unidos a proteínas a través de grupos funcionales específicos (amino, carboxilo, tiol, azida) y además varios grupos funcionales pueden estar presentes en el fluoróforo para modificar sus propiedades, por ejemplo, el fluoróforo que ha sido más utilizado en el desarrollo de esta tesis, el fura-2-acetoximetil éster (Figura 5.1 y Figura 5.2), donde los grupos carboxilo se convierten

en un éster para eliminar temporalmente la carga negativa de la molécula y facilitar así la permeabilidad hacia el interior de la célula (Figura 5.1).

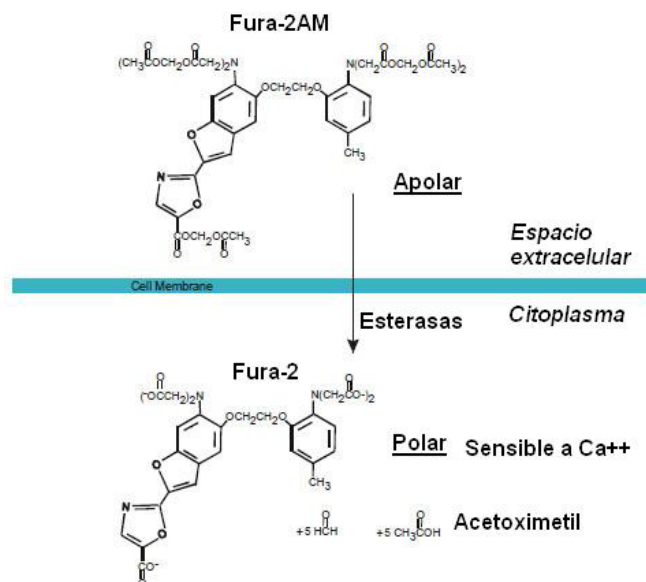


Figura 5.1- Esquema ilustrativo de cómo el fluorocromo fura-2-acetoximetil éster (fura-2AM) atraviesa la membrana celular. La sonda fura-2AM es un derivado permeable a la membrana plasmática del indicador de calcio ratiométrico fura-2. Cuando se añade a las células, el fura-2AM es capaz de atravesar la membrana celular ya que los grupos carboxilo de esta molécula se convirtieron en un éster y perdieron así la carga negativa que les impediría atravesarla; una vez en el citoplasma, los grupos acetoximetilo se eliminan mediante esterasas celulares. La eliminación de los ésteres de acetoximetilo regenera fura-2 que se une a iones de calcio libre intracelular.

La sonda fura-2-acetoximetil éster, a menudo abreviada como fura-2AM, es un derivado permeable a la membrana plasmática del indicador de calcio ratiométrico fura-2, utilizado en bioquímica para medir las concentraciones de calcio mediante métodos de fluorescencia. El fura-2AM, un ácido carboxílico poliamino, es una sonda fluorescente ratiométrica que se une a iones de calcio libre intracelular (Grynkiewicz y col., 1985). Fue la primera sonda fluorescente ampliamente usada para experimentos de imagen de calcio, volviéndose muy popular.

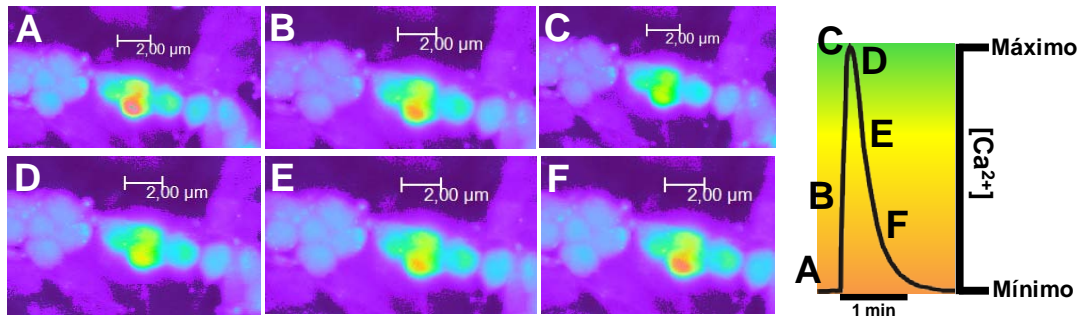


Figura 5.2- Imágenes de fluorescencia de células cromafines embrionarias de rata cargadas con la sonda fura-2-acetoximetil éster (fura-2AM). En el centro de las imágenes se observa una célula cromafín en donde la sonda ha penetrado de forma eficiente. En la imagen A (punto A del transiente de calcio de la derecha) la célula se encuentra en reposo siendo perfundida con la solución de Tyrode (la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol es de entorno a $0.1 \mu\text{M}$ y una mínima proporción de moléculas de sonda se encuentran unidas a iones Ca^{2+} y emitiendo fluorescencia, representado con colores marrones y anaranjados); en un momento determinado aplicamos un pulso de 10 s de estimulación perfundiendo una solución de Tyrode con alto potasio (45K^+), producimos una despolarización de la membrana celular y la apertura de CCDV, mayoritariamente los iones de Ca^{2+} libre que entran masivamente por los CCDV son captados por la mitocondria durante el periodo de estimulación y otra parte se unen a moléculas de la sonda produciéndose así un incremento de la fluorescencia emitida (imágenes B y C; punto B y C del transiente de calcio de la derecha); este incremento de la señal de fluorescencia es volcado al programa de imagen con tonalidades amarillas y verdes, cuando un número elevado de moléculas de sonda se han unido a iones Ca^{2+} . Una vez la estimulación cesa el Ca^{2+} de las mitocondrias es liberado hacia el citosol durante un periodo de minutos o segundos, produciéndose un aclaramiento por las bombas de Ca^{2+} (la bomba ATPasa de Ca^{2+} y el intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática) que puede durar segundos o minutos (imágenes D, E y F; puntos D, E y F del transiente de calcio); con el paso del tiempo cada vez hay menos iones de Ca^{2+} libre en el citoplasma dispuestos para unirse a la sonda y emitir fluorescencia, con lo que la señal del transiente de Ca^{2+} citosólico se va relajando hasta alcanzar valores basales.

Cuando se añade a las células, el fura-2AM atraviesa la membrana celular, y una vez dentro, los grupos acetoximetilo se eliminan mediante esterasas celulares (Figura 5.1). La eliminación de los ésteres de acetoximetilo regenera “fura-2”, el indicador de calcio pentacarboxilado (Figura 5.1). La sonda fura-2 es ratiométrica ya que es excitada a longitudes de onda de 340 nm y de 380 nm, y la razón de las emisiones a estas longitudes de onda está directamente correlacionada con el incremento de calcio intracelular. En presencia de calcio la sonda fura-2 emite a 510 nm de longitud de onda. El uso de esta razón o proporción en las longitudes de onda a las que la sonda es excitada cancela automáticamente determinadas variables que pueden producir confusión y darían lugar a artefactos en las mediciones, tales como las diferencias

locales en la concentración de sonda dentro de la célula, el diferente grosor celular y la disminución con el paso del tiempo de la concentración de sonda al ser esta consumida; estos postulados hacen de la sonda fura-2 una de las herramientas más apreciadas para cuantificar los niveles de calcio.

4.6.2 Procedimiento

Las células cromafines fueron incubadas durante 1 h a 37 °C en medio DMEM que contenía la sonda de calcio fura-2-acetoximetil éster (abreviada fura-2AM a la concentración de 10 μ M). Después de este periodo de incubación, los cubres de vidrio que contenían las células fueron montados sobre una cámara, y las células fueron perfundidas de forma continua con una solución de Tyrode compuesta de (en mM): 137 NaCl, 1 MgCl₂, 5.3 KCl, 2 CaCl₂, 10 HEPES y 10 glucosa, pH 7.3 ajustado con NaOH 1 M. El equipo que hemos utilizado para realizar los registros de fluorescencia estaba compuesto de un microscopio de luz invertida Leica DMI 4000 B (Leica Microsystems; Barcelona, Spain) equipado con un objetivo de aceite de inmersión (Leica 40 \times Plan Apo; apertura numérica 1.25).

Una vez que las células fueron colocadas sobre el microscopio, fueron continuamente bañadas por medio de un sistema de perfusión rápida con cinco vías de entrada y una única vía común de salida compuesta por un tubo Tygon® R3603 de 0.28 mm de diámetro cuya boca de salida se aproximaba a una distancia de entre 100-200 μ m de las células cromafines. Las células fueron perfundidas con la solución de Tyrode a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min; por medio de válvulas controladas eléctricamente se regulaba la salida de las diferentes soluciones que pudiera haber en los cinco depósitos; esta acción la realizábamos mediante un controlador de electroválvulas fabricado por SEGAINVEX situado en el “setup” exterior.

La sonda ratiométrica fura-2AM fue excitada alternativamente a 340 ± 10 nm y 387 ± 10 nm usando una lámpara de xenón Küber CODIX (Leica). La fluorescencia emitida fue recogida a través de un filtro de emisión de 540 ± 20 nm y medida con un dispositivo de cámara digital acoplado a un contador de intensidad de carga (controlador de cámara Hamamatsu C10600 orca R2; Japan). Las imágenes de fluorescencia fueron

generadas a intervalos de 1 s (Fig. 5.2), almacenadas digitalmente y analizadas utilizando un software LAS AF (Leica; Barcelona, Spain). Las células fueron perfundidas constantemente con la solución de Tyrode donde se encontraban disueltos los distintos fármacos de interés utilizados en los variados experimentos en los que nos servimos de esta técnica.

4.7 Estudio de las diferencias ultraestructurales en la distribución de vesículas cromafines mediante la técnica de microscopía electrónica

4.7.1 Generalidades

La microscopía electrónica es una técnica que requiere instrumentos de alta complejidad y personal altamente especializado. Se utilizan habitualmente la microscopía electrónica de transmisión o convencional y la microscopía electrónica de barrido. Las muestras para microscopía electrónica deben fijarse en glutaraldehído siguiendo las instrucciones para la toma y fijación de la muestra. Los fragmentos deben ser de pequeña talla y tienen que fijarse en forma de pequeñas porciones cuboideas de tejido de no más de 1 mm de longitud, obtenidas con la ayuda de una hoja de afeitar o bisturí limpios.

Las muestras se incluyen en resinas sintéticas (marca Epon por ejemplo) y se practican, con la ayuda de un ultramicrotomo, cortes 10 veces más delgados que los realizados en microscopía de luz, llamados cortes ultrafinos. La tinción se realiza con sales de metales pesados como *citrato de plomo*, *tetróxido de osmio* o *acetato de uranilo*, que permiten un contraste adecuado del tejido bajo el haz de electrones. Los cortes ultrafinos se montan sobre grillas de cobre, se tiñen y se observan al microscopio electrónico. Para documentar los hallazgos es necesario obtener fotografías en blanco y negro de las preparaciones. Las grillas, muestras, inclusiones y fotografías han de guardarse en un archivo especial durante años.

4.7.1.1 Microscopía electrónica de transmisión

El microscopio electrónico de transmisión es capaz de generar un haz de electrones a alta tensión (80kV) y concentrarlo sobre la preparación mediante un complejo sistema de campos electromagnéticos equivalentes a las "*lentes*" del microscopio de luz. En esta técnica un haz de electrones es acelerado a una gran velocidad al aplicarles una elevada diferencia de potencial, de forma que los electrones atraviesan la muestra, produciéndose la dispersión de los mismos en diferentes trayectorias características de la ultraestructura del material observado.

Colocando una barrera física de pequeña apertura angular por debajo del plano de la muestra, los electrones dispersados según ciertos ángulos, serán eliminados del haz, siendo la imagen formada menos intensa en aquellas zonas correspondientes a una mayor masa de la misma. La imagen formada es aumentada y proyectada sobre una pantalla fluorescente para su visualización en tiempo real, pudiendo registrarse tanto digitalmente como en negativos para su estudio posterior. La utilización de la Microscopia Electrónica de Transmisión nos permite entre otras posibilidades:

- La caracterización de distintos tipos celulares.
- Estudio de la ultraestructura celular y tisular.
- Localización de estructuras en el interior celular mediante inmunocitoquímica.
- Estudio de materiales.

La mayor utilidad de la microscopía electrónica de transmisión es en Oncología. Es particularmente útil en el diagnóstico de neoplasias malignas, ya que permite identificar la estirpe o diferenciación de una neoplasia. En conjunto con la inmunohistoquímica, permite identificar un alto porcentaje de las neoplasias malignas (95%).

4.7.1.2 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido permite el estudio de superficies celulares. La imagen se obtiene rastreando la superficie de la muestra con un haz electrónico ultrafino. Las señales generadas se recolectan, amplifican y captan en un tubo de rayos catódicos. Se utiliza por ejemplo de forma rutinaria en el estudio de enfermedades del tallo piloso. En estas condiciones hay anomalías estructurales y de superficie de los pelos, que pueden identificarse fácilmente con esta técnica. De esta forma, es posible incluso establecer un pronóstico de reversibilidad de las alteraciones utilizando esta técnica.

4.7.2 Procedimiento

Para realizar los experimentos de microscopía, las ratas adultas preñadas fueron anestesiadas con halotano y sacrificadas en el decimotavo día de gestación por perfusión con solución salina; posteriormente las glándulas adrenales de las ratas adultas fueron fijadas con un tampón preparado recientemente en el mismo día del experimento con la siguiente composición: 2 % paraformaldehído, 2 % glutaraldehído en 0.1 M de tampón fosfato, pH 7.4).

Varios de los embriones fueron también extraídos y cuidadosamente perfundidos a través del cordón umbilical con la misma solución anterior para asegurar un fijado adecuado. Las glándulas adrenales estuvieron además inmersas por otras dos horas en la solución de fijado a 4 °C. Posteriormente fueron incubadas con 1% de tetróxido de osmio en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.4), deshidratadas a través de una serie de concentraciones crecientes de etanol, y embebidas en resina Epon.

Se prepararon secciones ultrafinas de 60 nm de grosor y se tomaron imágenes a la resolución de 1024 x 1024 píxeles con 12.000 aumentos de magnificación sirviéndonos de un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL JEM1010 (100 KV). Otros componentes que han sido utilizados del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Universidad Autónoma de Madrid han sido los siguientes:

- Cámara BioScan de Gatan y sistema de análisis de imagen (DigitalMicrograph 3.1).
- Ultramicrotomo Leica Ultracut-E-42 con mesa antivibratoria. Cuchilla de diamante.
- Vibrotomo.
- Microscopio óptico Leitz Laborlux S con sistema de contraste de fase y equipo fotográfico Leica Wild MPS52.
- Laboratorio fotográfico.

RESULTADOS

5.- RESULTADOS

Esta Tesis Doctoral se ha desarrollado bajo el marco de una de las líneas de investigación del Instituto Teófilo Hernando, mantenida en los últimos ocho años, donde pretendemos estudiar la excitabilidad celular y como afectan las señales de Ca^{2+} a la exocitosis en células cromafines.

La entrada de calcio en la célula cromafin, la homeostasia intracelular del mismo por medio de las distintas organelas, proteínas de unión a Ca^{2+} y demás bombas de aclarado, junto con la génesis de los transientes de calcio citosólico y la respuesta exocitótica resultante de la aparición de estos transientes, han sido los pilares básicos de estudio en esta Tesis Doctoral.

La regulación de la respuesta a hipoxia en la **célula cromafín embrionaria de rata** (estímulo fisiológico en este modelo celular), junto con los cambios que ocurren durante el desarrollo, tanto en la en la regulación fina de la liberación de catecolaminas por la maquinaria de la exocitosis, como en la distribución de vesículas y en la ultraestructura misma de la célula son los ejes principales de la contribución científica que aportamos; y ponen de manifiesto como se dan claramente una serie de cambios durante el desarrollo en los mecanismos de exocitosis que sufren las células cromafines de rata.

El estudio de lo anteriormente señalado ha generado los artículos científicos que se exponen a continuación (algunos de ellos ya publicados y otros en vías de publicación); dichos trabajos científicos configuran el bloque de Resultados de esta Tesis Doctoral. Los cinco artículos primeros sobre estudios en CCER y su comparación con la CCM, constituyen el **núcleo central** de la Tesis Doctoral. Son los artículos 1 a 5 presentados en el anexo.

Resumen de los artículos, ya publicados o en vías de publicación, relacionados con esta Tesis Doctoral.

Artículos publicados o en vías de publicación que constituyen el núcleo central de esta Tesis Doctoral:

- 1.- **Fernández-Morales JC**, Cortés-Gil L, García AG, de Diego AM. Differences in the quantal release of catecholamines in chromaffin cells of rat embryos and their mothers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 297 (2):C407-418.
- 2.- Vestring S, **Fernández-Morales JC**, Padín JF, Castro-Musial D, Calvo-Gallardo E, García AG, de Diego AM. Distinct contribution of mitochondria to the regulation of calcium signalling and exocytosis in rat embryo and mother chromaffin cells.
- 3.- **Fernández-Morales JC**, García AG, de Diego AM. Two Steps of the Hypoxia-Induced Catecholamine Secretion from Rat Embryo Chromaffin Cells are Differentially Controlled by High-Voltage Activated Calcium Channel Subtypes. *Neuroscience Letters* 2013; Under review.
- 4.- De Diego AM, **Fernández-Morales JC**, Lorrio S, Díaz ME, García AG. Developmental changes of exocytotic quantal events and vesicle pools in rat chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; Under review.
- 5.- **Fernández-Morales JC**, Padín JF, Maroto M, Vestring S, Calvo-Gallardo E, Castro-Musial D, García AG, De Diego AM. Blockade of High-voltage Activated Calcium Channels Elicited by Nickel, Mibefradil and NNC 55-0396, in Rat Embryo and Bovine Chromaffin Cells.

A continuación presento un resumen en español de estos cinco artículos, que aparecen completos en el anexo de publicaciones de esta Tesis Doctoral.

Artículo 1.- Diferencias en la secreción cuantal de catecolaminas entre células cromafines embrionarias de rata y células cromafines de las ratas madre

Fernández-Morales JC, Cortés-Gil L, García AG, de Diego AM. Differences in the quantal release of catecholamines in chromaffin cells of rat embryos and their mothers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 297 (2):C407-418.

Resumen:

En éste estudio hemos descrito importantes diferencias cinéticas en los eventos exocitóticos que acontecen entre CCER y CCM, diferencias en el tamaño y contenido cuantal, en la frecuencia de “pies de espiga”, en la forma de la espiga amperométrica y en los patrones de secreción de eventos exocitóticos. Todo ello viene a sugerir dos modos de liberación de catecolaminas distintos durante la vida fetal y la etapa adulta. Además hemos encontrado que los bloqueantes selectivos de los distintos subtipos de CCDV de alto umbral de activación inhiben diferencialmente la secreción de catecolaminas en CCER y CCM.

Artículo 2.- Contribución diferencial de la mitocondria a la regulación de las señales de calcio y la exocitosis en células cromafines embrionarias de rata y células cromafines de las ratas madre

Vestring S, **Fernández-Morales JC**, Padín JF, Castro-Musial D, Calvo-Gallardo E, García AG, de Diego AM. Distinct contribution of mitochondria to the regulation of calcium signalling and exocytosis in rat embryo and mother chromaffin cells.

Resumen:

En este trabajo partimos de la hipótesis de que las diferencias en la regulación de la secreción promovida por el estímulo de hipoxia en células cromafines durante la vida perinatal y la etapa adulta pueden ser explicadas en parte a una contribución diferencial de la mitocondria en el control de las señales de calcio y la exocitosis.

Las diferencias en la distribución de vesículas en ambos tipos de células, exclusivamente en la vecindad de la membrana plasmática y cercanas a los CCDV en CCER y por todo el citoplasma en la CCM, junto con un posible y numeroso contingente de mitocondrias cercano a la membrana plasmática y en contacto íntimo con los CCDV en las CCER y la ausencia de este en las CCM, podrían explicar como la manipulación de la mitocondria interviniendo farmacológicamente la tasa de circulación mitocondrial del Ca^{2+} mediante herramientas farmacológicas muy selectivas de las bombas y transportadores de calcio mitocondriales, pondría de manifiesto unas diferencias drásticas en el control del calcio y la exocitosis en ambos tipos celulares, siendo este control del calcio mitocondrial muy importante en la CCER y menos en la CCM.

Artículo 3.- El control en dos periodos de la secreción de catecolaminas inducida por hipoxia en células cromafines embrionarias de rata se lleva a cabo diferencialmente por los distintos subtipos de canales de calcio dependientes de voltaje.

Fernández-Morales JC, García AG, de Diego AM. Two Steps of the Hypoxia-Induced Catecholamine Secretion from Rat Embryo Chromaffin Cells are Differentially Controlled by High-Voltage Activated Calcium Channel Subtypes. *Neuroscience Letters* 2013; Under review.

Resumen:

La I_{Ca} en las CCER es mediada tanto por CCDV del subtipo L (50%) como por los canales no L (N y PQ)—50%—; sin embargo mientras que los bloqueantes de los CCDV del subtipo L (nimodipino y nifedipino) inhiben casi totalmente la respuesta secretora promovida por hipoxia (RSPH), los bloqueantes de los CCDV de los subtipos no L combinados juntos solo la reducen en un 35 %. La RSPH tiene una fase inicial rápida promoviendo eventos secretores y una segunda fase más lenta con una exocitosis sostenida en el tiempo pero que asegura la mayoría de las espigas amperométricas. La RSPH estaría entonces inicialmente controlada por los subtipos de CCDV rápidamente inactivantes N y PQ junto con los lentamente inactivantes del subtipo L, mientras que la fase sostenida en el tiempo de la RSPH sería controlada solo por los CCDV del subtipo L

Artículo 4.- Cambios durante el desarrollo en los eventos exocitóticos aislados y en los contingentes de vesículas en la célula cromafín de rata

De Diego AM, **Fernández-Morales JC**, Lorrio S, Díaz ME, García AG. Developmental changes of exocytotic quantal events and vesicle pools in rat chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; Under review.

Resumen:

En la CCER, la secreción cuantal de catecolaminas ocurrida durante el estímulo fisiológico de hipoxia viene determinada por una serie de factores que difieren significativamente algunos de ellos de los encontrados en CCM, esto son entre otros, una distribución morfológica diferencial de las vesículas cromafines y diferentes tamaños en los contingentes de vesículas fácilmente liberables e inmediatamente liberables.

En las CCER el tamaño cuántico de los eventos amperométricos aislados fue constante mientras que el de CCM era siempre mayor y estímulo dependiente; hay más vesículas cromafines en las CCM, distribuidas por todo el citoplasma y solo un pequeño porcentaje de estas se encuentran en las cercanías de la membrana plasmática en comparación con CCER. Los contingentes de vesículas fácil e inmediatamente liberables son aproximadamente dos veces mayores en CCM que en CCER, aunque estas diferencias se reducen cuando corregimos estos datos respecto a la superficie de membrana de una y otra célula. Todos estos cambios pueden explicar los distintos patrones de exocitosis presentes en ambos tipos de células cromafines inmaduras (CCER) y desarrolladas (CCM).

Artículo 5.- Características del bloqueo de los canales de calcio de alto umbral de activación producido por níquel, mibefradilo y NNC 55-0396 en células cromafines bovinas y células cromafines de rata embrionaria frente al estímulo fisiológico de hipoxia

Fernández-Morales JC, Padín JF, Maroto M, Vestring S, Calvo-Gallardo E, Castro-Musial D, García AG, De Diego AM. Blockade of High-voltage Activated Calcium Channels Elicited by Nickel, Mibefradil and NNC 55-0396, in Rat Embryo and Bovine Chromaffin Cells.

Resumen:

El Ni^{2+} , mibefradilo y NNC bloquean completamente la corriente de bario (I_{Ba}) que pasa a través de los canales de calcio de alto umbral de activación con IC_{50} de 50, 5 y 2 μM respectivamente. El bloqueo y la recuperación del mismo son muy lentos en el caso del mibefradilo y NNC; para estos compuestos además se observa una tiempo-dependencia en el efecto de bloqueo sobre los transientes de calcio citosólico. La secreción de catecolaminas promovida por K^+ en ambos tipos de células, y la promovida por hipoxia en células cromafines embrionarias de rata, fueron totalmente bloqueadas por estos compuestos. Todos estos resultados ponen de manifiesto que hay que ser muy cuidadoso al utilizar estos compuestos como herramientas farmacológicas para estudiar el papel fisiológico de los CCDV de alto y de bajo umbral de activación en sistemas celulares que expresan ambos tipos de canales, como es el caso de las células cromafines embrionarias de rata.

Artículos relacionados con esta Tesis Doctoral donde hemos estudiado el papel que poseen ciertos elementos del ciclo del Ca^{2+} celular y de componentes de la triada funcional para modelar las señales de calcio y la exocitosis en la célula cromafín: modulación farmacológica actuando sobre CCDV por el compuesto ITH33/IQM9.21, regulación de la exocitosis por el antioxidante resveratrol vía RE o la contribución del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática a la generación de las señales citosólicas de calcio y a la exocitosis final.

- 6.- Maroto M, de Diego AM, Albiñana E, **Fernández-Morales JC**, Caricati-Neto A, Jurkiewicz A, Yáñez M, Rodríguez-Franco MI, Conde S, Arce MP, Hernández-Guijo JM, García AG. Multi-target novel neuroprotective compound ITH33/IQM9.21 inhibits calcium entry, calcium signals and exocytosis. *Cell Calcium* 2011; 50 (4):359-369.
- 7.- Padín JF, de Diego AM, **Fernández-Morales JC**, Merino C, Maroto M, Calvo-Gallardo E, Arranz JA, Yáñez M, García AG. Resveratrol augments nitric oxide generation and causes store calcium release in chromaffin cells. *Eur J Pharmacol* 2012; 685(1-3):99-107.
- 8.- **Fernández-Morales JC**, Yáñez M, Orallo F, Cortés L, González JC, Hernández-Guijo JM, García AG, de Diego AM. Blockade by nanomolar resveratrol of quantal catecholamine release in chromaffin cells. *Mol Pharmacol* 2010 78(4):734-44.
- 9.- Padín JF, **Fernández-Morales JC**, Olivares R, Vestring S, Pascual R, Arranz-Tagarro JA, Calvo-Gallardo E, Colmena I, Gandía L, García AG. A novel role for the plasmalemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger revealed at physiological temperature: shaping of Ca^{2+} and exocytotic signals during depolarisation of chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013 Under review.

A continuación presento un resumen en español de estos cuatro artículos, que aparecen completos en el anexo de publicaciones de esta Tesis Doctoral.

Artículo 6.- Estudio sobre la modulación de los canales de calcio y la exocitosis por el compuesto ITH33/IQM9.21 en la célula cromafín bovina

Maroto M, de Diego AM, Albiñana E, **Fernandez-Morales JC**, Caricati-Neto A, Jurkiewicz A, Yáñez M, Rodriguez-Franco MI, Conde S, Arce MP, Hernández-Guijo JM, García AG. Multi-target novel neuroprotective compound ITH33/IQM9.21 inhibits calcium entry, calcium signals and exocytosis. *Cell Calcium* 2011; 50 (4):359-369.

Resumen:

El compuesto ITH33/IQM9.21 (ITH/IQM) pertenece a una nueva familia de compuestos derivados del ácido L-glutámico con propiedades neuroprotectoras y antioxidantes, tanto en modelos *in vivo* como en modelos *in vitro* de infarto cerebral.

Hemos encontrado que el ITH/IQM bloquea las elevaciones de la concentración de calcio citosólico y por consiguiente disminuye la respuesta exocitótica promovida por estímulos despolarizantes en célula cromafín bovina.

Estos efectos son debidos a un bloqueo de la corriente de Ca^{2+} de entrada a través de los CCDV; el daño neuronal producido después del infarto de miocardio se encuentra estrechamente ligado a un exceso en la entrada de Ca^{2+} y a una sobrecarga del calcio neuronal produciendo una distorsión del ciclo del calcio neuronal (CCN). El ITH/IQM puede contribuir a un efecto neuroprotector en neuronas vulnerables durante periodos de isquemia cerebral.

Artículo 7.- Señales de calcio generadas por el resveratrol en célula cromafín bovina e incremento de la generación de óxido nítrico

Padín JF, de Diego AM, **Fernández-Morales JC**, Merino C, Maroto M, Calvo-Gallardo E, Arranz JA, Yáñez M, García AG. Resveratrol augments nitric oxide generation and causes store calcium release in chromaffin cells. *Eur J Pharmacol* 2012; 685(1-3):99-107.

Resumen:

Las bajas concentraciones de resveratrol (1 μ M) producen ligeros incrementos de la concentración de calcio citosólico y estos transientes de calcio son bloqueados cuando se depleta el retículo endoplásmico; el resveratrol además incrementa la producción de nitritos y óxido nítrico (NO).

El bloqueo de la liberación cuantál de catecolaminas en células cromafines bovinas producido por el resveratrol acontecería como resultado de inducir estos transientes de calcio citosólico leves y localizados e incrementar la producción de NO, que estaría bloqueando los últimos pasos del procesos exocitótico.

Artículo 8.- Bloqueo de la liberación cuantal de catecolaminas por concentraciones nanomolares de resveratrol en célula cromafín bovina

Fernández-Morales JC, Yáñez M, Orallo F, Cortés L, González JC, Hernández-Guijo JM, García AG, de Diego AM. Blockade by nanomolar resveratrol of quantal catecholamine release in chromaffin cells. *Mol Pharmacol* 2010 78(4):734-44.

Resumen:

En este trabajo se ha demostrado que las concentraciones nanomolares de resveratrol (30 y 300 nM) bloquean la liberación cuantal de catecolaminas en célula cromafín bovina, sin afectar a las corrientes nicotínicas ni a los canales de Ca^{2+} y Na^{+} dependientes de voltaje, no ejerciendo ningún efecto tampoco sobre los transientes de calcio citosólico promovidos por estímulos despolarizantes de K^{+} o ACh.

El bloqueo, por concentraciones nanomolares de resveratrol de la secreción en células cromafines bovinas tratadas con ionomicina o digitonina sugiere un sitio de acción del resveratrol sobre la maquinaria exocitótica siendo un proceso Ca^{2+} -independiente. Estas concentraciones incrementan los niveles de GMPc sugiriendo la participación de la vía de la L-arginina-NO y un posible efecto de bloqueo de la secreción de catecolaminas a través de un mecanismo ligado al NO, en los últimos pasos del proceso exocitótico.

Los pacientes con estrés crónico sometidos a una descarga continua y masiva de catecolaminas pueden beneficiarse del efecto cardioprotector del resveratrol; ya que un consumo moderado de vino tinto, donde abunda esta molécula, es suficiente para alcanzar en sangre estas concentraciones a las que es activa.

Artículo 9.- Un nuevo papel para el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática: Contribución en la génesis de las señales citosólicas de calcio y en las respuestas exocitóticas durante pulsos despolarizantes en células cromafines

Padín JF, **Fernández-Morales JC**, Olivares R, Vestring S, Pascual R, Arranz-Tagarro JA, Calvo-Gallardo E, Colmena I, Gandía L, García AG. A novel role for the plasmalemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger revealed at physiological temperature: shaping of Ca^{2+} and exocytotic signals during depolarisation of chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013 Under review.

Resumen:

En este trabajo proponemos que bajo condiciones de temperatura fisiológica (37 °C) pero no a 22 °C, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática (NCX) puede contribuir a la formación de los transientes de calcio citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) y a la liberación exocitótica promovidas por pulsos despolarizantes largos. Esta contribución tendría lugar ya que durante la despolarización el modo reverso del NCX puede, junto con los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, contribuir a la entrada de Ca^{2+} a la célula y una vez que el estímulo despolarizante finaliza, el NCX vuelve a realizar su actividad en el modo directo, sacando Ca^{2+} al exterior celular, y contribuyendo a acelerar el aclarado de los transientes de Ca^{2+} citosólico generado durante el estímulo despolarizante.

Artículos de revisión ya publicados sobre temas relacionados con las señales de calcio, la exocitosis y la neuroprotección, relacionados con esta Tesis Doctoral.

- 10.- **Fernández-Morales JC**, Arranz-Tagarro JA, Calvo-Gallardo E, Maroto M, Padín JF, García AG. Stabilizers of neuronal and mitochondrial calcium cycling as a strategy for developing a medicine for Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci* 2012; 3 (11):873-83.
- 11.- García AG, Padín JF, **Fernández-Morales JC**, Maroto M, García-Sancho J. Cytosolic organelles shape calcium signals and exo-endocytotic responses of chromaffin cells. *Cell Calcium* 2012; 51:309-320.

A continuación y como se ha hecho anteriormente presento un resumen en español de estos dos artículos, que aparecen completos en el anexo de publicaciones de esta Tesis Doctoral.

Artículo 10.- Artículo de revisión sobre una visión general de la homeostasia celular del calcio

Fernández-Morales JC, Arranz-Tagarro JA, Calvo-Gallardo E, Maroto M, Padín JF, García AG. Stabilizers of neuronal and mitochondrial calcium cycling as a strategy for developing a medicine for Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci* 2012; 3 (11):873-83.

Resumen:

El ion calcio (Ca^{2+}) actúa como un mensajero intracelular que regula una multitud de funciones fisiológicas. En células excitables y neuronas que están constantemente disparando potenciales de acción a varias frecuencias, los iones de calcio se someten a un ciclo continuo, entrando a través de canales de calcio de la membrana plasmática; posteriormente son secuestrados intracelularmente por las proteínas de unión a Ca^{2+} y por las organelas, particularmente el retículo endoplásmico y las mitocondrias; seguidamente el calcio se libera de estas organelas hacia el citosol y para cerrar el ciclo sale de la célula a través de los transportadores de Ca^{2+} de la membrana plasmática como son la bomba de Ca^{2+} ATP_{asa} y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

En este resumen nos centramos en dos dianas que podrían estar involucradas en la enfermedad de Alzheimer (EA) como son la distorsión del ciclo del calcio neuronal (CCN) y la distorsión del ciclo del calcio mitocondrial (CCM). Estas dianas pueden ser el origen de la vulnerabilidad de las neuronas y la causa de su muerte en la EA de igual forma que puede afectar un exceso de producción de radicales libres a neuronas vulnerables. Nuestro grupo se encuentra experimentalmente probando la hipótesis de que la fina regulación de los movimientos del Ca^{2+} se encuentra perturbada en neuronas vulnerables de los cerebros de pacientes con EA. Estos movimientos del Ca^{2+} son responsables de la generación de señales que son vitales para la supervivencia y comunicación neuronal. Por lo tanto, la desregulación de los movimientos del calcio puede conducir a una sobrecarga de calcio, el calcio se vuelve neurotóxico y causa la muerte neuronal por vía apoptótica.

Actualmente hay evidencias que indican que un CCN incrementado y un CCM pobre o nimio son el punto central en la activación de proteínas como calpaína y calcineurina, así como de la vía mitocondrial intrínseca para la apoptosis, promoviendo la muerte de neuronas vulnerables. Un factor de contribución adicional a la muerte neuronal es el exceso en la producción de radicales libres junto con la distorsión de la homeostasia del Ca^{2+} . Un fármaco trifuncional que actúe en los CCDV, en el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial y que tenga además propiedades antioxidantes podría frenar estos ciclos viciados de Ca^{2+} y prolongar la supervivencia neuronal y el retraso en la progresión de la EA.

Artículo 11.- Artículo de revisión sobre la regulación de las señales de calcio, de exocitosis y endocitosis en célula cromafín

García AG, Padín JF, **Fernández-Morales JC**, Maroto M, García-Sancho J. Cytosolic organelles shape calcium signals and exo-endocytotic responses of chromaffin cells. *Cell Calcium* 2012; 51:309-320.

Resumen:

El control de las señales de calcio citosólico en células cromafines es complejo y depende de diferentes subtipos de CCDV, de los tampones de calcio citosólico, de la captación y la liberación de calcio por parte de las organelas citoplasmáticas tales como la mitocondria, el retículo endoplásmico, el núcleo o las vesículas cromafines y por último de los mecanismos de eliminación del calcio tales como la ATP_{asa} dependiente de Ca^{2+} de la membrana plasmática y del intercambiador $Na^+ Ca^{2+}$.

El estudio de las tasas del flujo de calcio entre los diferentes compartimentos celulares nos ha llevado a plantear la hipótesis de que las células cromafines han desarrollado tétradas funcionales de Ca^{2+} que estarían compuestas por los CCDV, las proteínas tamponadoras de Ca^{2+} citosólico, el retículo endoplasmático y la población de mitocondrias que se encuentran cerca de los sitios de exocitosis activa de la membrana plasmática. Esta tétrada funcional es la responsable de conformar los transientes de calcio citosólico que ocurren durante la excitación celular y regular los pasos iniciales y finales del proceso de exocitosis y la subsiguiente respuesta endocitótica.

DISCUSIÓN

6.- DISCUSIÓN

En células excitables como las cromafines y en neuronas que están constantemente disparando potenciales de acción a varias frecuencias, los iones de Ca^{2+} se someten a un ciclo continuo, entrando a través de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (CCDV) de la membrana plasmática; posteriormente estos iones son secuestrados intracelularmente por las proteínas de unión a Ca^{2+} y las organelas como el retículo endoplásmico y las mitocondrias (artículos 10 y 11; García y col., 2006). A continuación, el Ca^{2+} se libera de estas organelas hacia el citosol y finalmente es expulsado al exterior celular a través de transportadores de Ca^{2+} de la membrana plasmática.

La génesis y el desarrollo de los transientes de calcio citosólico en las células cromafines es un mecanismo complejo que depende de la participación de los componentes anteriormente mencionados (artículos 10 y 11): Hay una dependencia de los diferentes subtipos de CCDV, de las proteínas de unión a calcio citosólico, de cómo las distintas organelas (retículo y mitocondria principalmente pero también el núcleo y las vesículas cromafines) van a captar y liberar de nuevo el calcio al citosol; y finalmente el aclaramiento de los transientes de calcio citosólico va a depender directamente de los mecanismos de eliminación del calcio tales como los transportadores de Ca^{2+} de la membrana plasmática; la bomba de Ca^{2+} ATP_{asa} o el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Varias de estas dianas celulares han estado constantemente presentes a lo largo de la realización de esta tesis doctoral, habiendo centrado nuestro estudio en tres pilares básicos: la entrada de Ca^{2+} vía CCDV, los transientes de calcio citosólicos que ocurren durante la excitación celular y la resultante final del proceso exocitótico, la fusión calcio dependiente de las vesículas cromafines con la membrana celular.

Es de especial interés en nuestro grupo de investigación entender la fina regulación de los movimientos del Ca^{2+} . Estos movimientos de Ca^{2+} son responsables de la generación de señales que son vitales para la supervivencia y la comunicación

neuronal; a su vez la desregulación de los mismos puede conducir por ejemplo a la sobrecarga de calcio, el calcio se vuelve neurotóxico y causa la muerte celular por vía apoptótica (artículo 10). Además de una distorsión de la homeostasia del Ca^{2+} la producción de radicales libres contribuye también a la muerte celular y se encuentra estrechamente ligada con la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial. Hay una serie de estas dianas celulares que constantemente pretendemos estudiar para comprender mejor y poder llegar a controlar esta fina regulación de la homeostasia del Ca^{2+} , nos interesa:

1.- Actuar sobre los CCDV, compuestos como el ITH33/IQM9.21 (ITH/IQM) bloquea la corriente de Ca^{2+} de entrada a través de CCDV, reduce los transientes de Ca^{2+} citosólico y disminuye la respuesta exocitótica (artículo 6).

2.- Estudiar la regulación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial y el de la membrana plasmática. En otro de los trabajos objeto de esta tesis hemos demostrado como el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática a temperatura fisiológica contribuye a la génesis y al aclaramiento de los transientes citosólicos de Ca^{2+} , además de a las respuestas exocitóticas frente a estímulos despolarizantes (artículo 9).

3.- Encontrar un compuesto antioxidante que contrarreste la producción de radicales libres y tenga acciones adicionales sobre los transientes de calcio citosólico o la exocitosis. En este sentido hemos descubierto que un potente antioxidante como el resveratrol a concentraciones nanomolares bloquea la exocitosis en célula cromafín mediante un mecanismo mediado por leves y localizados transientes de Ca^{2+} provenientes del RE que promueven un incremento en los niveles de NO (artículos 7 y 8).

4.- Nos interesa estudiar en profundidad la contribución de la mitocondria en la regulación de las señales de calcio y la exocitosis, especialmente en célula cromafín embrionaria; el núcleo de esta tesis doctoral versa sobre la regulación de la exocitosis en célula cromafín embrionaria de rata frente al estímulo fisiológico de hipoxia. Hay varios trabajos que apuntan a la mitocondria como un posible sensor de oxígeno. La mitocondria y el NADPH se ha visto que participan en el control de la respuesta secretora frente a hipoxia (Mojet y col., 1997; Thompson y col., 2007). Las diferencias

en la regulación de la secreción promovida por el estímulo de hipoxia en células cromafines durante la vida perinatal y en la etapa adulta se podrían explicar mediante un control diferencial de la mitocondria en el control de las señales de calcio y la exocitosis (artículo 2).

Una de las principales aportaciones de este trabajo ha sido la descripción por vez primera de las diferencias existentes entre células cromafines de embriones de rata y de sus madres tanto en la distribución de vesículas cromafines, como en los contingentes vesiculares, así como las diferencias en la liberación cuantal de catecolaminas, producida por despolarizaciones de alto K^+ . Tales diferencias concernientes a ambos tipos de células afectan a la secreción en forma de salva de espigas, la forma de los eventos secretores, la cinética de las espigas amperométricas individuales, y los subtipos de CCDV involucrados en promover la exocitosis.

Los resultados publicados anteriormente (Fernández-Morales y col., 2009) en conjunto con nuevos experimentos utilizando el estímulo fisiológico de hipoxia en CCER y observaciones de ME ponen de manifiesto que se dan claramente una serie de cambios durante el desarrollo en los mecanismos de exocitosis que sufren las células cromafines de rata.

Hemos observado que las espigas amperométricas de CCER promovidas por el estímulo fisiológico de hipoxia son más parecidas a aquellas que acontecen frente a un leve estímulo despolarizante de K^+ ($25 K^+$) (Figura 1 del artículo 4). Sin embargo, las espigas amperométricas de CCER se vuelven más rápidas y de mayor amplitud cuando se las somete a un fuerte estímulo despolarizante de alto K^+ ($75 K^+$) (Figura 1, tablas 1 y 2 del artículo 4). Este dato sugiere que las CCER poseen alguna clase de mecanismo que regula la maquinaria de la exocitosis dependiendo del estímulo fisiológico al que son sometidas.

El contenido cuántico de las vesículas en CCER permanece sin embargo constante, alrededor de 0.2 pC sea cual sea el estímulo al que son sometidas (Hipoxia, $25 K^+$, $25K^+ + Bay-K 8644$ ó $75 K^+$) (tabla 1 del artículo 4); por el contrario, las CCM

muestran distintos patrones secretores y una dependencia del tamaño cuántico (Qamp) en función del tipo de estímulo al que son sometidas (Fernández-Morales y col., 2009).

Estos datos se han corroborado al realizar un análisis morfométrico de las vesículas cromafines de CCER y CCM mediante el análisis de imágenes tomadas con ME de secciones ultrafinas de ambas médulas adrenales. Hemos asumido que el volumen de las vesículas cromafines es proporcional al contenido de catecolaminas que posee, que es una medida del Qamp. Por lo tanto, si calculamos la relación de los radios entre CCM y CCER utilizando las micrografías de los experimentos de ME obtenemos un valor de 1.78; este valor indicaría que el volumen de las vesículas de CCM es 1.78 veces superior al de CCER en condiciones basales sin estimular (resultados y discusión del artículo 4).

Por otra parte cuando lo que hacemos es una relación entre los tamaños cuánticos (Qamp) de las espigas amperométricas de CCM y CCER que registramos tras un estímulo de 25 K⁺, obtenemos un valor parecido (1.8). Sin embargo si aplicamos un estímulo despolarizante fuerte (75 K⁺), esta relación se incrementa hasta 2.9 (resultados y discusión del artículo 4). Esto indicaría que es posible que la célula cromafín de rata desarrolle al madurar mecanismos que modulen la maquinaria de la exocitosis de forma que sea capaz de regular más finamente el tipo de vesícula que va a ser liberada respecto a su tamaño cuántico dependiendo de la intensidad del estímulo que lo promueve.

Este mecanismo podría seleccionar vesículas más grandes en CCM cuando se aplica un estímulo despolarizante fuerte; significaría que la CCM pero no tanto la CCER podría tener vesículas cromafines más grandes y/o con un tamaño cuántico más variable; esto ya ha sido observado en células cromafines adultas de ratón (Grabner y col., 2005). También podría estar sucediendo una exocitosis multivesicular o compuesta donde las espigas amperométricas registradas de mayor tamaño podrían ser el resultante de complejos de varias vesículas cromafines agregadas entre sí en el momento de sufrir la exocitosis (Álvarez de Toledo y Fernández, 1990; Creutz y Pollard, 1983).

Es llamativo que la distribución de las vesículas cromafines o vesículas grandes de núcleo denso (VND) se distribuyen cerca de la membrana plasmática en las CCER

mientras que en las CCM se localizan a lo largo de todo el citoplasma (Figura 2 del artículo 4). En CCER, la mayoría de las VND aparecen estratégicamente localizadas en la vecindad de la membrana plasmática donde se encontrarían rápidamente disponibles para sufrir exocitosis. En CCER el 63 % de todas las vesículas se encuentran a menos de 300 nm de la membrana plasmática, mientras que este porcentaje se reduce a tan solo el 15 % en las CCM (Figura 2, panel H del artículo 4). Más llamativo resulta todavía que el porcentaje de vesículas que se encuentran a menos de 100 nm de la membrana plasmática sea del 26 % en CCER y de tan solo un 3 % en CCM; esto podría dar una idea de que los contingentes de vesículas inmediatamente liberables (IRP) y fácilmente liberables (RRP) sean mayores (respecto al número total de vesículas cromafines) en CCER que en CCM como discutiremos más adelante.

Otra característica llamativa del estudio de las micrografías es que la mayoría de las CCM muestran una polarización que no aparece de forma tan clara en las CCER, con el núcleo situado en un extremo y la mayoría de las VND en el otro extremo (Figura 2A,B del artículo 4). El número de VND por célula en secciones ultrafinas de Microscopía Electrónica de Transmisión fue 6.5 veces mayor en CCM.

En un estudio se describe la aparición y el desarrollo de los distintos contingentes vesiculares (IRP y RRP) durante la maduración de las sinapsis en neuronas de hipocampo de rata (Mozhayeva y col., 2002). En las CCER, que se encuentran también en proceso de desarrollo, pendientes de que acontezca la maduración de la sinápsis esplácnica, puede acontecer un proceso similar, sobre todo si consideramos las diferencias que existen en la distribución de las vesículas entre CCER y CCM.

El contingente de vesículas dispuestas para ser liberadas (RRP) es entre 1.25 y 1.75 veces mayor en CCM que en CCER; de forma parecida el contingente de vesículas inmediatamente liberables (IRP) es entre 1.26 y 2.1 veces mayor en CCM. Sin embargo hay que considerar para estos cálculos que la superficie de membrana plasmática no es igual en ambos tipos de células cromafines. La simple observación *de visu* pone de manifiesto unas diferencias apreciables en el tamaño de una y otra célula. Este incremento en el área con el desarrollo de las células cromafines lo hemos registrado mediante dos técnicas diferentes; midiendo directamente el área de las células en las

secciones de Microscopía electrónica de transmisión e indirectamente a través de las medidas de capacidad de la membrana celular mediante experimentos con patch-clamp.

Las variaciones en la talla celular que hemos encontrado para CCER y CCM están en consonancia con las registradas por otros autores (Coupland y Tomlinson, 1989). Las medidas de capacidad de la membrana (C_m) en CCM revelan que el área de su membrana plasmática es 1.8 veces superior a la de CCER; esto hace que la relación entre CCM y CCE para los tamaños del RRP o IRP, una vez normalizado respecto al área celular, estos contingentes vesiculares sean prácticamente similares en ambos tipos de células.

Puede ser una estrategia utilizada por las CCER el hecho de que durante las primeras etapas del desarrollo embrionario estas células maximicen la eficacia de las respuestas exocitóticas localizando las pocas vesículas que poseen cerca de los sitios de liberación. Estas diferencias en la distribución de las VND y en los tamaños de los contingentes vesiculares más preparados para sufrir exocitosis sugieren la posibilidad de que la maquinaria exocitótica pueda sufrir cambios durante el desarrollo de la célula cromafín.

Una vez discutidos los aspectos referentes a la distribución de las vesículas y la organización de los contingentes vesiculares profundizaremos en los datos que hemos adelantado sobre los distintos modos de secreción “*estímulo-dependientes*” en CCER y CCM; para ello pasaremos a discutir en profundidad los datos referentes a los registros amperométricos y a los análisis de espiga única.

La secreción acumulativa (Q_{amp}) de la salva de espigas producida por un pulso de $75K^+$ fue un 35% mayor en CCM, cuando la comparamos con CCER (Figura 1C derecha del artículo 1). Esto es consistente con el mayor tamaño cuántico de las espigas individuales en CCM. Considerando que las CCM tienen tres veces mayor tamaño cuántico que las CCER (tabla 1 del artículo 1) y que el número de espigas fue similar (Figura 1C izquierda del artículo 1), el contenido cuántico de la salva secretora debería ser más grande que el 35%. Esta discrepancia puede ser debida a la inclusión de la onda envolvente en el cálculo de la secreción acumulativa; de tal forma que la onda

envolvente inicial fue encontrada más frecuentemente en CCER (43% de los trazos) que en CCM (12% de los trazos). Adicionalmente, las CCER exhiben de media un 42% de espigas múltiples, compuestas por varias espigas solapadas en un corto intervalo de tiempo (que aporta carga amperométrica en el análisis de secreción acumulativa, pero que no pueden ser analizadas individualmente debido a su solapamiento), comparado con tan solo el 9% en CCM. Esto puede explicar en parte que la razón de secreción acumulativa CCM/CCER (1.35) era substancialmente más pequeña que la razón del tamaño cuantal de la espiga individual CCM/CCER (aproximadamente 3.0).

La diferente forma de los eventos secretores aislados y la distinta cinética de las espigas únicas, apuntan a favor de dos modos diferentes de exocitosis que median la liberación de catecolaminas de la médula adrenal durante el desarrollo fetal y en la etapa adulta. La elevada frecuencia de espigas dobles o triples y de la onda envolvente sugiere un modo de secreción más rápida en CCER, donde se estaría movilizandopreferencialmente un depósito de vesículas altamente acoplado al estímulo y listas para ser secretadas —*contingente de vesículas* inmediatamente liberables— (IRP), (Neher, 1998).

El mayor número de espigas con pie en la CCM (70%) que en la CCER (45%) —Figura 2C del artículo 1—, indica que la secreción debe ser mucho más lenta en la etapa adulta, comparado con la vida fetal. Está bien descrito que la génesis del “*pie de espiga*” es debido a la formación del poro de fusión, el cual permite la liberación de pequeñas cantidades de catecolaminas que salen fuera de la vesícula; posteriormente la vesícula que se encuentra unida a la membrana plasmática por el poro de fusión puede retraerse y frustrar el proceso de exocitosis —fenómeno de kiss-and-run como un modo de exo-endocitosis (Harata y col., 2006)— o bien sufrir una exocitosis completa. En cualquiera de las espigas con pie puede observarse que la espiga amperométrica (que sigue al “*pie de espiga*”) registrada como un incremento rápido en la oxidación de catecolaminas, es debida a la expansión completa del poro de fusión, integrándose totalmente la membrana de la vesícula cromafín con la membrana plasmática y liberando todo su contenido al espacio extracelular (Chow y col., 1992).

Los parámetros cinéticos (tabla 1 del artículo 1) también indican que las espigas amperométricas registradas con el estímulo de 75K^+ fueron igualmente más rápidas en CCER que en CCM; la velocidad de ascenso de la espiga (rise rate) era similar en ambos tipos de células; sin embargo, la amplitud (I_{max}), la $t_{1/2}$ y el tiempo de caída de la espiga son más pequeños en CCER y sostienen una velocidad más rápida de liberación de catecolaminas en CCER, comparado con CCM.

Hemos observado otra diferencia entre CCER y CCM después de estimular con una baja concentración de 25 mM de K^+ (25K^+); éste suave estímulo despolarizante produce eventos secretores con parámetros cinéticos consistentes con una baja secreción en ambos tipos de células. Esto concuerda con los dos modos de secreción recientemente descritos por el laboratorio de Smith, usando altos y bajos concentraciones de estímulo despolarizante en células cromafines de ratón adulto (Fulop y col., 2005). En CCER las espigas amperométricas desencadenadas por el estímulo fisiológico de hipoxia fueron más similares en algunos parámetros cinéticos a las obtenidas por una leve despolarización (25K^+), pero difieren considerablemente de aquellas producidas por un fuerte estímulo despolarizante (75K^+). Esto puede ser explicado por la observación de que la tasa y la cantidad de Ca^{2+} que entra por los CCDV regulan la apertura y cierre del poro de fusión (Ales y col., 1999; Fulop y Smith., 2007).

Es probable que en nuestro caso los estímulos de 25K^+ e hipoxia generen patrones más parecidos en los transientes de calcio citosólico que conduzcan a un modo de secreción similar, eventos amperométricos con espigas más pequeñas y anchas, indicando una liberación mas sostenida de las catecolaminas almacenadas en una sola vesícula cromafín. Esto puede explicarse sobre la base de que las vesículas cromafines se encuentran más cercanas a la membrana plasmática en las CCER comparado con su distribución por todo el citoplasma en las CCM como señalamos anteriormente. Un menor número de vesículas cromafines con un contenido cuantitativo más pequeño puede explicar por qué las CCER, que se encuentran no innervadas, puedan requerir que estas vesículas se encuentren más cercanas a los sitios exocitóticos y así asegurar una rápida respuesta para adaptar al organismo al estrés de hipoxia durante la vida fetal y perinatal.

Si forzamos un incremento en la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV de tipo L por el uso de $1\mu\text{M}$ de BayK8644 encontramos que los parámetros cinéticos están incrementados en CCM, pero no en CCER (tabla 3 del artículo 1). Así, de este modo, el aumento de la entrada de Ca^{2+} a través de CCDV del subtipo L, en cualquiera de las dos situaciones, por aplicación de un fuerte estímulo despolarizante (75K^+) o por un estímulo despolarizante ligero (25K^+) en presencia de BayK8644, causa eventos exocitóticos más lentos en CCM, pero no en CCER. Esto sugiere que en células cromafines adultas los pasos finales de la exocitosis están fuertemente regulados por la entrada del calcio (Ales y col., 1999). Esta regulación no se ha visto que se encuentre tan establecida en células fetales inmaduras y denervadas.

Una última diferencia drástica en la regulación de la liberación de catecolaminas entre CCER y CCM, concierne a los distintos papeles de los CCDV de tipo L y no-L (N/PQ) en el control de la respuesta secretora evocadas por pulsos despolarizantes de alto potasio (75K^+) o frente al estímulo fisiológico de hipoxia. Se ha estudiado con anterioridad en nuestro grupo la contribución relativa de cada subtipo de canal de calcio a la corriente de Ca^{2+} (I_{Ca}) en estudios de patch-clamp, en la configuración de célula entera en células cromafines de rata adulta (Gandia y col., 1995).

En esta tesis se describe por vez primera de forma exhaustiva la densidad relativa de los distintos subtipos de CCDV de alto umbral de activación expresados en CCER, por medio de una disección mediante agentes farmacológicos de la I_{Ca} acarreada a través de CCDV de tipo L y de tipo N/PQ mediante experimentos de patch-clamp en la configuración de célula entera (Figura 1 del artículo 3), los resultados de este estudio electrofisiológico ponen de manifiesto una densidad relativa de CCDV similar a la descrita anteriormente en nuestro laboratorio (Gandía y col., 1995) o a la descrita por otros autores con células cromafines de rata adulta (Kim y col., 1995).

Utilizando una concentración supramáxima de nimodipino ($3\mu\text{M}$) la I_{Ca} en CCER se reduce aproximadamente un 50 %; mientras que una concentración saturante de ω -conotoxina MVIIC ($2\mu\text{M}$) (que es conocido que bloquea completamente la I_{Ca} en células cromafines acarreada a través de los CCDV de subtipos N y PQ), en nuestro caso reduce en aproximadamente otro 50 % la I_{Ca} en CCER. Como se puede ver en la

figura 1 del artículo 3, la combinación de nimodipino y MVIIC reduce prácticamente toda la I_{Ca} en CCER salvo una pequeña proporción de corriente residual resistente a estos agentes farmacológicos que puede ser atribuida a I_{Ca} acarreada por lo CCDV de bajo umbral de activación o tipo T. De igual forma una disección de la I_{Ca} que se realizó de forma paralela sobre las CCM no muestra diferencias sustanciales en la densidad relativa de los distintos subtipos de CCDV en comparación con CCER.

Como ya hemos comentado en el párrafo anterior en un trabajo realizado por el grupo de Kim y col. (1995) sobre célula cromafín de rata adulta el canal L acarrea sobre el 50-60% de la I_{Ca} y controla una proporción similar de la respuesta secretora. Por otro lado, en uno de los pocos trabajos que estudian la I_{Ca} en CCER, se demuestra que éstas expresan ambos tipos de CCDV, canales de Ca^{2+} de alto umbral de activación y canales de Ca^{2+} de bajo umbral de activación (tipo T), pero solo los primeros contribuyen a la secreción de catecolaminas en células cromafines embrionarias (Bournaud y col., 2001). No existían apenas estudios que posibiliten discernir cómo los diferentes CCDV contribuyen a proveer el Ca^{2+} necesario para promover la exocitosis durante la despolarización celular en CCER.

En esta tesis nosotros demostramos que en CCER, los canales L dominan el control de la respuesta secretora promovida por pulsos despolarizantes de $75K^+$ (artículo 1) y frente al estímulo fisiológico de hipoxia (artículo 3), los canales N/PQ tienen solamente una muy pequeña contribución. Este no fue el caso para las CCM donde los canales de tipo L y no-L contribuyen de forma muy parecida a la secreción promovida por el estímulo de $75K^+$ (tabla 4 de la discusión).

De forma parecida a como sucede con los pulsos despolarizantes de alto potasio ($75K^+$) (Fernández-Morales y col., 2009), hemos descubierto que la respuesta secretora inducida por hipoxia de las CCER es reducida en torno a un 90 % al bloquear selectivamente los CCDV del subtipo L (Figura 2 y 3A del artículo 3); por el contrario, el bloqueo por separado de los CCDV de los subtipos N o P/Q apenas reduce en cada uno de los casos aproximadamente un 15 % la respuesta secretora promovida por el estímulo fisiológico de hipoxia (Figura 3 del artículo 3); de forma conjunta la inhibición de los CCDV de subtipos N y P/Q por el cóctel de toxinas ω -conotoxina GVIA y ω -

agatoxina IVA incrementa este bloqueo de la respuesta secretora por hipoxia hasta aproximadamente un 35% (Figura 3 del artículo 3).

Tabla 4. Contribución de los canales de Ca^{2+} de tipo L y no-L a la secreción de catecolaminas en células cromafines embrionarias (CCER) y en células cromafines de sus madres (CCM) frente al estímulo despolarizante de alto potasio (75K^+).

	% del número de espigas respecto del control		% de Q_{amp} respecto del control	
	No L (3 μM nimodipino)	L (1 μM ω -ctx-MVII-C)	No L (3 μM nimodipino)	L (1 μM ω -ctx-MVII-C)
CCER	### 11.83 \pm 1.98 (10.00)	### 101.62 \pm 6.95*** (93.17)	### 14.63 \pm 2.03 (13.53)	### 104.12 \pm 8.24*** (102.31)
CCM	42.14 \pm 4.09*** (38.30)	54.65 \pm 6.56*** (53.74)	47.15 \pm 4.53*** (49.56)	51.66 \pm 5.07*** (38.15)

Los grupos fueron comparados usando el test de Kruskal-Wallis, CCER tratadas con nimodipino (símbolo *) o CCM tratadas con nimodipino (símbolo #). En ambos casos, los parámetros Q_{amp} y número de espigas produjeron resultados similares. El grupo de CCM tratadas con MVIIC, el grupo de CCER tratadas con nimodipino y el grupo de CCM tratadas con nimodipino presentaban diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de CCER tratadas con nimodipino (*** $p < 0.001$). Los grupos de CCER tratadas con MVIIC y de CCER tratadas con nimodipino eran diferentes estadísticamente del grupo de CCM tratadas con nimodipino (### $p < 0.001$) en ambos parámetros: Q_{amp} y el número de espigas. El grupo de CCM tratado con MVIIC y los grupos de nimodipino fueron iguales estadísticamente. Aún cuando los datos no cumplían la asunción de homogeneidad de varianzas, un test ANOVA seguido de un test de Bonferroni post-hoc frente a los grupos control mostraba exactamente los mismos resultados. Los datos son presentados como la media \pm e.e. y también como la mediana entre paréntesis.

Podría pensarse que durante la vida fetal solo los canales de tipo L se expresan; sin embargo, los experimentos que hemos mencionado anteriormente usando la técnica de patch-clamp en la configuración de célula entera, han confirmado que la corriente de entrada de Ca^{2+} en CCER tiene componentes que son igualmente sensibles a 3 μM de nimodipino (bloqueo del subtipo de canales L) y a 1 μM de MVIIC (bloqueo de los subtipos de canales no-L) — Figuras 8A, B, C y G del artículo 1—; por lo tanto los subtipos de CCDV L y N/PQ contribuyen aproximadamente igual en un 50 % a la I_{Ca} .

Una expresión similar en los CCDV durante el desarrollo se ha registrado en células cromafines ovinas (Keating y col., 2009).

Esto sugiere que las CCER expresan canales N/PQ funcionales, que no son capaces sin embargo de proveer el suficiente Ca^{2+} (o de hacerlo con la misma eficiencia que los canales L) para disparar la liberación de catecolaminas en estas células. La posibilidad de que los canales L estén acoplados de forma física o simplemente funcional a la maquinaria de la exocitosis más fuertemente que los canales N/PQ debe ser estudiada más en profundidad, y podría explicar la gran contribución de los CCDV del subtipo L al control de la respuesta secretora inducida por hipoxia o por estímulos fuertemente despolarizantes; (se ha intentado sin éxito realizar estudios preliminares de colocalización de proteínas de la maquinaria de la exocitosis y de la subunidad $\alpha 1\text{C}$ del CCDV del subtipo L). Una posible alternativa a estas explicaciones es que en las CCER los canales N/PQ son inactivados más rápidamente que los canales L, como parece ocurrir en célula cromafín bovina (Villarroya y col., 1999; Hernandez-Guijo y col., 2001).

Se puede observar que en la mayoría de las CCER la respuesta secretora inducida por hipoxia comienza con una notable salva inicial de espigas seguida por una disminución paulatina de la frecuencia de espigas amperométricas a lo largo del periodo de 1 min que dura el estímulo hipóxico —Figuras 2A-P1 del artículo 3 y Figura 4A,B (tiempo de estímulo 0-10 s) del artículo 3—. Algo similar ocurre con el estímulo de 75K^+ , pues en la mayoría de las células hay una fuerte salva de espigas con una llamativa envolvente de carga amperométrica durante los primeros 10 s y la actividad secretora permanece incluso un tiempo después de los 10 s del pulso de 75K^+ (Figura 1A, B del artículo 1) aunque ésta exhibe una tendencia a decaer con el tiempo (Figura 4A del artículo 1).

Es probable que los canales N/PQ, pero no los canales L sean rápidamente inactivados con los primeros segundos del estímulo hipóxico o de 75K^+ (Hernandez-Guijo *et al.*, 1997; Villarroya *et al.*, 1999). De esta forma los CCDV del subtipo L y N/PQ contribuirían de forma conjunta y por igual en la fase inicial de la salva secretora; sin embargo en etapas más avanzadas del estímulo hipóxico o posteriores a los primeros

segundos de $75K^+$, la menor inactivación de los CCDV del subtipo L pudiera proveer el Ca^{2+} necesario para extender la respuesta secretora durante periodos de tiempo más largos, aunque esto suceda con una tasa de secreción más baja (Figura 4 del artículo 3).

Estos resultados ponen de manifiesto una respuesta secretora promovida por el estímulo fisiológico de hipoxia en dos secuencias temporales bien definidas, controladas de forma diferencial por los distintos subtipos de CCDV: mientras que la primera salva de secreción de espigas amperométricas en respuesta a la hipoxia sería accionada por el Ca^{2+} que entra tanto a través de los CCDV del subtipo L como de los subtipos N y P/Q (aproximadamente el 35 % de todas las espigas recogidas durante el estímulo hipóxico de 1 min), en las etapas posteriores de la respuesta secretora promovida por hipoxia únicamente el subtipo L de CCDV, el cual se inactiva más lentamente, podría controlar dicha respuesta (65 % del total de la respuesta secretora a hipoxia acontecida en 1 min) (Figura 4 del artículo 3).

Durante la vida fetal y postnatal esta respuesta de las células cromafines frente al estímulo fisiológico de hipoxia secretando catecolaminas de forma masiva y sostenida en el tiempo es fundamental para incrementar la supervivencia y la adaptación de los individuos neonatos; por lo tanto tan solo el Ca^{2+} acarreado a través del CCDV del subtipo L (lentamente inactivante) podría garantizar esta secreción de catecolaminas sostenida en el tiempo frente al estrés hipóxico.

Es difícil poder clarificar el papel de los canales de bajo umbral de activación o canales tipo T en el control de la respuesta secretora inducida por hipoxia. Como hemos comentado anteriormente, el grupo de Shimahara describió la presencia de canales T en solo el 50 % de las CCER (Bournaud y col., 2001); la proporción de CCER en las que nosotros observamos corriente T es menor. Este grupo observó que un tren de pulsos despolarizantes causa una significativa entrada de calcio a través de los CCDV de tipo T; sin embargo esta entrada de Ca^{2+} no es capaz de promover la exocitosis y si el Ca^{2+} que entra a través de CCDV de alto umbral de activación. Sin embargo, encontraron todo lo contrario el grupo de López-Barneo en 2009 trabajando sobre rodajas de medula adrenal de ratas neonata, el bloqueo de los CCDV de tipo T con 50 μM de Ni^{2+} o 1 μM

de pimozida inhiben completamente la respuesta secretora inducida por hipoxia (Levitsky y Lopez-Barneo, 2009).

Una explicación que dan estos autores a este descubrimiento es que se ha observado un incremento en la excitabilidad de las células cromafines que expresan CCDV de tipo T (Carabelli y col., 2007), así como que el calcio que entra a través de los CCDV de bajo umbral de activación o tipo T potencia las respuestas secretoras frente a leves despolarizaciones de la membrana plasmática (Carbone y col., 2006; Gancippoli y col., 2006; Carbone y Carabelli, 2009). Una posible hipótesis, punto en común entre los resultados de estos autores y los nuestros podría ser que tanto los CCDV de bajo umbral de activación o tipo T junto con los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} pueden controlar la excitabilidad celular y el disparo de potenciales de acción; estas dos acciones servirían para reclutar al resto de CCDV de alto umbral de activación (L, N, P/Q) que van a proveer el suficiente Ca^{2+} necesario para accionar la secreción de catecolaminas inducida por hipoxia en las dos etapas comentadas anteriormente, donde el CCDV del subtipo L adquiere el mayor protagonismo.

De forma similar a lo que observaron Levitsky y Lopez-Barneo (2009), nosotros también hemos encontrado que los bloqueantes de los CCDV de tipo T: Ni^{2+} , mibefradilo y NNC 55-0396, disminuyen la respuesta secretora inducida por hipoxia en CCER (Figuras 9 y 10 del artículo 5); pero de forma diferente al bloqueo completo que ellos observan nosotros apreciamos solo una reducción parcial con concentraciones cercanas a las que ellos utilizaron; 41 μM de Ni^{2+} bloquea aproximadamente un 60 % de la respuesta secretora a hipoxia y mibefradilo 0.9 μM bloquea aproximadamente un 30 % de la respuesta secretora frente al estímulo hipóxico (Figura 10 del artículo 5). Un compuesto que el grupo de López-Barneo no han utilizado ha revelado unos datos muy interesantes; se trata de un derivado del mibefradilo, el NNC 55-0396 que ha sido definido como altamente selectivo para inhibir las corrientes tipo T (Huang y col., 2004). En nuestro laboratorio a concentraciones relativamente bajas de 0.4 μM reduce prácticamente casi por completo la respuesta secretora promovida por hipoxia —Figura 10D del artículo 5— (en más de un 80%).

Desafortunadamente, estos compuestos definidos como selectivos para inhibir los CCDV de bajo umbral de activación o tipo T no lo son realmente; o para bloquear estos canales se requieren determinadas concentraciones que afectan al resto de CCDV de alto umbral de activación (Figuras de 1 a la 8 del artículo 5); por lo tanto en la actualidad no disponemos de bloqueantes realmente selectivos de los CCDV de bajo umbral de activación o tipo T (Catterall, 2011), y sin embargo si que existen compuestos altamente selectivos para los CCDV de alto umbral de activación (García y col., 2006): las 1,4-dihidropiridinas para los CCDV del subtipo L y las ω -toxinas peptídicas para los CCDV de los subtipos N y P/Q.

Los bloqueantes de los CCDV de bajo umbral de activación o tipo T (Ni^{2+} , mibefradilo, pimozida o NNC) han de ser usados para discernir el papel de los CCDV de bajo umbral de activación en el control de varias funciones fisiológicas en células que expresen única o mayoritariamente CCDV de bajo umbral de activación. Sin embargo, en CCER que expresan tanto CCDV de alto umbral de activación (L, N, P/Q) como de bajo umbral de activación (T), el uso de estos bloqueantes de CCDV de tipo T (con selectividad limitada) dificulta poder esclarecer el papel de estos canales en el control de la respuesta secretora promovida por hipoxia y la interpretación de esos resultados puede llevarnos a conclusiones erróneas.

Tal y como podemos comprobar en todos los datos que aportamos a lo largo del artículo 5, las concentraciones que han sido usadas a lo largo de múltiples trabajos recogidos en la literatura de Ni^{2+} , mibefradilo y NNC para bloquear los CCDV de tipo T causan un bloqueo substancial (50-90 %) tanto de la I_{Ba} que atraviesa CCDV de alto umbral de activación, como de los transientes de Ca^{2+} citosólicos promovidos por un pulso despolarizante de alto potasio (45K^+), como de las respuestas secretoras promovidas por pulsos despolarizantes de alto potasio (45K^+) en CCER y CCB. El uso del ratón transgénico con la depleción de los genes que codifican para la subunidad proteica que conforman el CCDV de tipo T (Chen y col., 2003) podría facilitar una mejor comprensión de la función de estos canales en la respuesta secretora inducida por hipoxia y podría ser un excelente modelo como continuación al trabajo realizado en esta tesis doctoral.

Hemos encontrado un dato desconcertante que necesita ser confirmado con futuros experimentos; el nimodipino a la concentración de 3 μM revierte completamente la despolarización provocada por la hipoxia en experimentos en los que registramos el potencial de membrana bajo la configuración de “*current-clamp*”; es interesante resaltar aquí que las toxinas ω -contoxina GVIA y ω -agatoxina IVA a la concentración ambas de 1 μM aplicadas tanto de forma separada como conjunta; ejercen una muy leve hiperpolarización sobre la despolarización evocada por hipoxia; además cuando registramos el potencial de membrana en reposo esta leve hiperpolarización por las toxinas se confirma. Se pone de manifiesto claramente que el Ca^{2+} que entra a través de los distintos subtipos de CCDV está contribuyendo al control de la despolarización promovida por el estímulo de hipoxia. El Ca^{2+} que entra a través de los canales N/PQ tiene un papel nimio mientras que el Ca^{2+} que entra a través del CCDV del subtipo L está contribuyendo decisivamente al control de la despolarización ejercida durante el estímulo hipóxico.

Como ya hemos comentado en la introducción hay varios trabajos que ponen de manifiesto que las bajas presiones parciales de O_2 causan una disminución parcial de la corriente de K^+ mediada a través de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de alta conductancia (canales BK) (Thompson y Nurse, 1998). Bournaud y col. (2007) observaron en CCER como la hipoxia inactiva de igual forma canales BK. De forma parecida el bloqueo de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de baja conductancia (canales SK) resultó ser el responsable de la despolarización evocada por el estímulo hipóxico en células cromafines embrionarias de oveja (Keating y col., 2009).

Los efectos de hiperpolarización del V_m durante el estímulo de hipoxia sugieren que el Ca^{2+} que entra a través de los CCDV del subtipo L podría ser el responsable de la inactivación tónica vía segundos mensajeros intracelulares de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} . Los CCDV del subtipo L y los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} podrían cooperar juntos para mantener el potencial de reposo de la membrana celular. Debido al potencial de equilibrio altamente positivo para el ión Ca^{2+} , la entrada de este catión tendería a despolarizar la CCER, mientras que al mismo tiempo se activan canales SK y BK lo que tendría el efecto contrario hiperpolarizante. Este “diálogo”

entre los canales de K^+ y de Ca^{2+} estaría colaborando en el mantenimiento del potencial de membrana de reposo.

Nuestro estudio tiene implicaciones fisiológicas y clínicas. La médula adrenal del feto y del organismo neonato juega un papel más relevante en la adaptación al estrés que en el adulto (Slotkin y Seidler, 1988). De hecho, en los humanos recién nacidos hay un pronunciado incremento de la liberación de catecolaminas de la médula adrenal en el momento del alumbramiento (Lagercrantz y Bistoletti, 1977; Lagercrantz y Slotkin, 1986). Esta secreción puede ayudar al neonato en la adaptación de las funciones respiratoria, cardiovascular y metabólica a las nuevas exigencias de la vida extrauterina (Jones y col., 1979).

Durante el parto pueden darse una serie de complicaciones en las que este se produce de manera anormal o con dificultad; puede ser el resultado de contracciones uterinas no correctamente coordinadas o de una posición anormal del feto durante el alumbramiento y a este fenómeno se le conoce como distocia; esta posición incorrecta del feto en el momento del nacimiento puede llevar por ejemplo a la parada de flujo sanguíneo por compresión del cordón umbilical (Schneider, 2001; Richardson y col., 1996); de igual forma, durante la distocia de hombro fetal, la presión en el cuello impide la correcta entrada de sangre arterial al cerebro y la salida de sangre venosa (Jensen y col., 1991). También se dan casos donde de forma desafortunada el cordón umbilical puede enrollarse alrededor del cuello del feto y comprimirse. En estos casos en el feto se dificultaría la oxigenación vía placentaria y desembocaría en un proceso hipóxico agudo donde una temprana y apropiada secreción de catecolaminas incrementaría las posibilidades de supervivencia del feto.

Así, de este modo, no es sorprendente que interferir negativamente con este rápido y prolongado en el tiempo incremento de catecolaminas esté asociado con un descenso de las expectativas de supervivencia (Lagercrantz y Bistoletti, 1977; Jones y col., 1979; Seidler y Slotkin, 1985; Lagercrantz y Slotkin, 1986). En este contexto, nuestros resultados sugieren que el tratamiento de las mujeres embarazadas con bloqueantes de los canales de Ca^{2+} de tipo L, particularmente con derivados de la 1,4 dihidropiridina, pueden estar formalmente contraindicados porque estos pueden reducir

drásticamente el incremento de catecolaminas que ocurre durante el alumbramiento. Además, nuestros resultados sugieren que un fármaco que active moderadamente los canales de Ca^{2+} de tipo L puede ser una buena herramienta terapéutica para disminuir el riesgo de padecer el síndrome de muerte súbita infantil tanto en el momento del alumbramiento como durante las primeras semanas de vida del recién nacido.

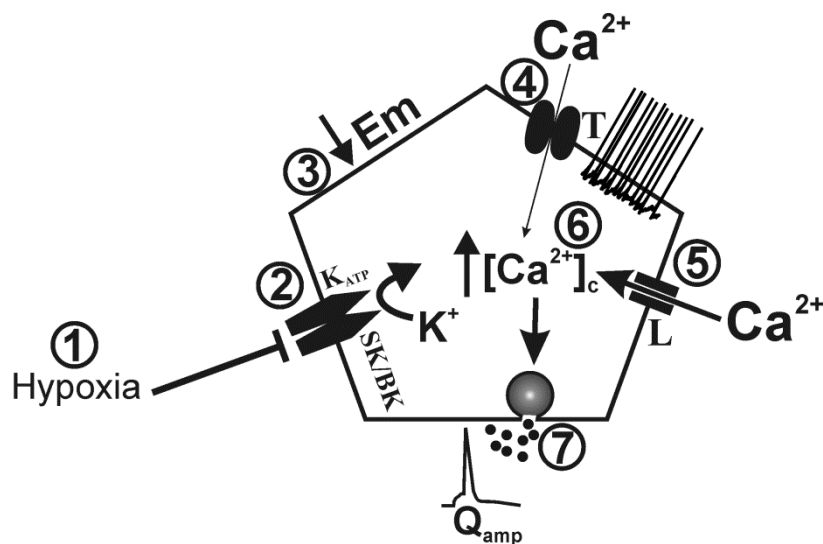
CONCLUSIONES

7.- CONCLUSIONES

A partir de los resultados presentes en los trabajos que aportamos en esta Tesis Doctoral y de su análisis y discusión nos aventuramos a extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- Hemos encontrado diferencias llamativas entre CCER y CCM referente a los patrones de secreción, la cinética de los eventos exocitóticos individuales y los subtipos de CCDV implicados en disparar la exocitosis promovida por un fuerte estímulo despolarizante de alto K^+ ; estos datos apuntan a dos modos o patrones de secreción distintos en ambos tipos celulares, a una exocitosis mucho más regulada en la CCM y por lo tanto a un incremento en la capacidad de regulación de la exocitosis durante el desarrollo.
- 2.- Los cambios que encontramos en el tamaño cuantal, la distribución diferencial de las vesículas secretoras y la diferente organización de los distintos *contingentes vesiculares* pueden ser los responsables de los distintos patrones de secreción encontrados entre células cromafines adultas (CCM) y células en vías de desarrollo (CCER).
- 3.- La densidad relativa de los distintos subtipos de CCDV de alto umbral de activación (L, N, P/Q) estudiada mediante disección farmacológica en CCER es similar a la encontrada en CCM y en célula cromafín de rata adulta. Encontramos un 50% de corriente L y un 50% de corriente no-L (N, P/Q); sin embargo la contribución relativa del CCDV de tipo L a la secreción de catecolaminas promovida por el estímulo de hipoxia es prácticamente absoluta, dependiendo casi un 90 % de la respuesta secretora del Ca^{2+} que acarrea el CCDV del subtipo L.
- 4.- En el esquema 1 exponemos el mecanismo de la secreción de catecolaminas inducida por la hipoxia según nuestros resultados. La secreción de

catecolaminas que ocurre durante la exposición de la CCER al estímulo de hipoxia estaría inicialmente controlada por la entrada de Ca^{2+} a través de todos los subtipos de CCDV de alto umbral de activación. Una segunda fase de secreción de catecolaminas sostenida y prolongada en el tiempo es controlada mayoritariamente por el Ca^{2+} acarreado a través de los CCDV lentamente inactivantes del subtipo L. Los canales de K_{Ca} de alta y baja conductancia (BK y SK) de forma conjunta con los K_{ATP} y K_{O_2} (2) y los CCDV de bajo umbral de activación o tipo T (4), pueden controlar la excitabilidad celular (3) y el disparo de ráfagas de potenciales de acción (6), lo que ayudaría a reclutar a los CCDV de alto umbral de activación (5) que son capaces de aportar el Ca^{2+} suficiente para disparar las dos fases de la respuesta secretora (7) a hipoxia en CCER.

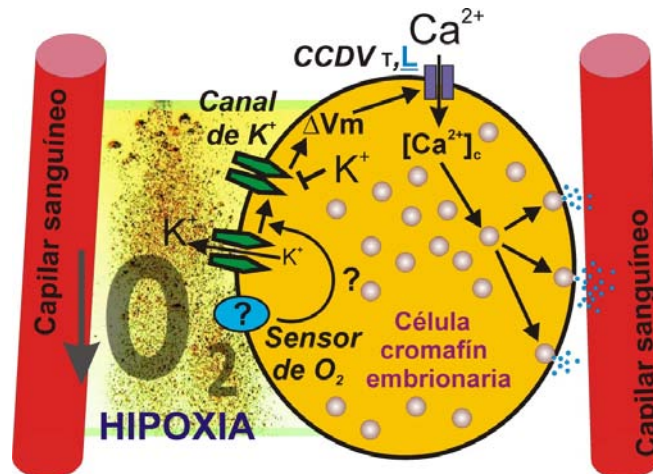


Esquema 1: Diagrama ilustrativo sobre la posible comunicación entre los CCDV de bajo umbral de activación (tipo T) y de alto umbral del subtipo L para regular la secreción de catecolaminas promovida por el estímulo de hipoxia en la CCER.

- 5.- Podemos concluir que un ion inorgánico (Ni^{2+}) y dos compuestos orgánicos (mibefradilo y un derivado de este, el NNC 55-0396) los cuales han sido ampliamente utilizados como acreditados bloqueantes de los CCDV de bajo umbral de activación (tipo T), son de igual forma diana de los CCDV de alto umbral de activación tanto en CCB como en CCER; bloqueando a las concentraciones definidas en la literatura como selectivos de los canales T tanto las I_{Ba} que pasan a través de los CCDV de alto umbral de activación,

como los transientes de Ca^{2+} citosólico y la secreción de catecolaminas promovida por 75K^+ y por hipoxia.

- 6.- La manipulación farmacológica de la circulación mitocondrial del Ca^{2+} mediante compuestos que bloquean las bombas y transportadores de Ca^{2+} mitocondriales demuestran que el control del Ca^{2+} mitocondrial es muy importante en la CCER, donde las señales de calcio y la exocitosis puede verse muy afectada y tiene menos importancia en la célula cromafín madura (CCM). Esta contribución importante de la mitocondria en las células cromafines durante la etapa perinatal sería responsable en gran parte de la secreción promovida por el estímulo de hipoxia; son varios los trabajos que apoyan esta conclusión y que apuntan a la mitocondria como el sensor de oxígeno, según se refleja en el esquema 2.



Esquema 2: Diagrama que representa la contribución importante de la mitocondria en las células cromafines durante la etapa perinata y que sería responsable en gran parte de la secreción promovida por el estímulo de hipoxia.

AYUDAS DE INVESTIGACIÓN

8.- AYUDAS DE INVESTIGACIÓN

Este trabajo fue apoyado durante todos estos últimos años por siguientes Instituciones Españolas gracias a ayudas económicas conseguidas por Antonio García García:

- (1) Proyecto SAF 2006-03589, Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN)
- (2) RETICS-RD 06/0026, Instituto de Saludo Carlos III (MICINN)
- (3) S-SAL-0275-2006, Comunidad Autónoma de Madrid, España
- (4) Agencia Laín Entralgo, Comunidad Autónoma de Madrid, España
- (5) Proyecto SAF 2010-21795, Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN)
- (6) Cátedra de Patrocinio UAM/Bioibérica de Inflamación Crónica y Citoprotección (CABICYC)
- (7) Fundación Eugenio Rodríguez Pascual

Quisiera agradecer especialmente al Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN) por la beca predoctoral FPI concedida durante los años 2007-2011 y al continuo apoyo de la Fundación Teófilo Hernando durante todos estos últimos años.



BIBLIOGRAFÍA

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Abramson DC. (1972). Delivery room management of the distressed infant. *Am Fam Physician* **6**, 60-66.
- Adams MB, Simonetta G & McMillen IC. (1996). The non-neurogenic catecholamine response of the fetal adrenal to hypoxia is dependent on activation of voltage sensitive Ca²⁺ channels. *Brain Res Dev Brain Res* **94**, 182-189.
- Aguilar JS, Ballesta JJ, Reig JA, Palmero M, Viniegra S & Criado M. (1992). Muscarinic receptor subtypes in bovine adrenal medulla. *Neurochem Res* **17**, 1235-1239.
- Akaike N, Kanaide H, Kuga T, Nakamura M, Sadoshima J & Tomoike H. (1989). Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *J Physiol* **416**, 141-160.
- Albillos A, Dernick G, Horstmann H, Almers W, Alvarez de Toledo G & Lindau M. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* **389**, 509-512.
- Albillos A, Neher E & Moser T. (2000). R-Type Ca²⁺ channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J Neurosci* **20**, 8323-8330.
- Aldea M, Jun K, Shin HS, Andres-Mateos E, Solis-Garrido LM, Montiel C, Garcia AG & Albillos A. (2002). A perforated patch-clamp study of calcium currents and exocytosis in chromaffin cells of wild-type and alpha(1A) knockout mice. *J Neurochem* **81**, 911-921.
- Ales E, Cano-Abad M, Garcia AG & Lopez MG. (2002). Different cellular distribution of calbindin D28k: implications for the cytosolic Ca(2+) and exocytotic signals in single bovine and mouse chromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci* **971**, 168-170.
- Ales E, Tabares L, Poyato JM, Valero V, Lindau M & Alvarez de Toledo G. (1999). High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat Cell Biol* **1**, 40-44.
- Aloe L & Levi-Montalcini R. (1979). Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells in vivo into sympathetic neurons: effect of antiserum to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1246-1250.

- Alonso MT, Barrero MJ, Michelena P, Carnicero E, Cuchillo I, Garcia AG, Garcia-Sancho J, Montero M & Alvarez J. (1999). Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol* **144**, 241-254.
- Alvarez de Toledo G, Fernandez-Chacon R & Fernandez JM. (1993). Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* **363**, 554-558.
- Alvarez de Toledo G & Fernandez JM. (1990). Compound versus multigranular exocytosis in peritoneal mast cells. *J Gen Physiol* **95**, 397-409.
- Alvarez YD, Ibanez LI, Uchitel OD & Marengo FD. (2008). P/Q Ca^{2+} channels are functionally coupled to exocytosis of the immediately releasable pool in mouse chromaffin cells. *Cell Calcium* **43**, 155-164.
- Anderson DJ & Axel R. (1986). A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. *Cell* **47**, 1079-1090.
- Andres-Mateos E, Renart J, Cruces J, Solis-Garrido LM, Serantes R, de Lucas-Cerrillo AM, Aldea M, Garcia AG & Montiel C. (2005). Dynamic association of the Ca^{2+} channel $\alpha 1A$ subunit and SNAP-25 in round or neurite-emitting chromaffin cells. *Eur J Neurosci* **22**, 2187-2198.
- Annaert WG, Llona I, Backer AC, Jacob WA & De Potter WP. (1993). Catecholamines are present in a synaptic-like microvesicle-enriched fraction from bovine adrenal medulla. *J Neurochem* **60**, 1746-1754.
- Artalejo CR, Garcia AG & Aunis D. (1987). Chromaffin cell calcium channel kinetics measured isotopically through fast calcium, strontium, and barium fluxes. *J Biol Chem* **262**, 915-926.
- Ashery U, Varoqueaux F, Voets T, Betz A, Thakur P, Koch H, Neher E, Brose N & Rettig J. (2000). Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J* **19**, 3586-3596.
- Augustine GJ & Neher E. (1992a). Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol* **450**, 247-271.
- Augustine GJ & Neher E. (1992b). Neuronal Ca^{2+} signalling takes the local route. *Curr Opin Neurobiol* **2**, 302-307.

- Aunis D. (1998). Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Int Rev Cytol* **181**, 213-320.
- Babcock DF, Herrington J, Goodwin PC, Park YB & Hille B. (1997). Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network. *J Cell Biol* **136**, 833-844.
- Banks P & Helle K. (1965). The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem J* **97**, 40C-41C.
- Barald KF. (1988). Antigen recognized by monoclonal antibodies to mesencephalic neural crest and to ciliary ganglion neurons is involved in the high affinity choline uptake mechanism in these cells. *J Neurosci Res* **21**, 119-134.
- Barbara JG & Takeda K. (1995). Voltage-dependent currents and modulation of calcium channel expression in zona fasciculata cells from rat adrenal gland. *J Physiol* **488** (Pt 3), 609-622.
- Beam KG & Knudson CM. (1988). Calcium currents in embryonic and neonatal mammalian skeletal muscle. *J Gen Physiol* **91**, 781-798.
- Bean BP. (1985). Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* **86**, 1-30.
- Bean BP. (1989). Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* **51**, 367-384.
- Becherer U & Rettig J. (2006). Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res* **326**, 393-407.
- Bennett MK, Calakos N & Scheller RH. (1992). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* **257**, 255-259.
- Berger PJ, Skuza EM, Brodecky V & Wilkinson MH. (2002). Physiology: the ventilatory response to hypoxia. *Nature* **419**, 686; discussion 686.
- Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V & Di Lisa F. (1999). Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* **264**, 687-701.
- Berridge MJ. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21**, 13-26.

- Bers DM. (2000). Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res* **87**, 275-281.
- Biales B, Dichter M & Tischler A. (1976). Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J Physiol* **262**, 743-753.
- Biesold D, Kurosawa M, Sato A & Trzebski A. (1989). Hypoxia and hypercapnia increase the sympathoadrenal medullary functions in anesthetized, artificially ventilated rats. *Jpn J Physiol* **39**, 511-522.
- Bilodeau ML, Boulineau T, Hullinger RL & Andrisani OM. (2000). Cyclic AMP signaling functions as a bimodal switch in sympathoadrenal cell development in cultured primary neural crest cells. *Mol Cell Biol* **20**, 3004-3014.
- Bilodeau ML, Ji M, Paris M & Andrisani OM. (2005). Adenosine signaling promotes neuronal, catecholaminergic differentiation of primary neural crest cells and CNS-derived CAD cells. *Mol Cell Neurosci* **29**, 394-404.
- Bisagno V, Raineri M, Peskin V, Wikinski SI, Uchitel OD, Llinas RR & Urbano FJ. (2010). Effects of T-type calcium channel blockers on cocaine-induced hyperlocomotion and thalamocortical GABAergic abnormalities in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **212**, 205-214.
- Biscoe TJ, Purves MJ & Sampson SR. (1970). The frequency of nerve impulses in single carotid body chemoreceptor afferent fibres recorded in vivo with intact circulation. *J Physiol* **208**, 121-131.
- Bittner MA & Holz RW. (1992). Kinetic analysis of secretion from permeabilized adrenal chromaffin cells reveals distinct components. *J Biol Chem* **267**, 16219-16225.
- Blackwell CC, MacKenzie DA, James VS, Elton RA, Zorgani AA, Weir DM & Busuttil A. (1999). Toxigenic bacteria and sudden infant death syndrome (SIDS): nasopharyngeal flora during the first year of life. *FEMS Immunol Med Microbiol* **25**, 51-58.
- Blackwell CC, Saadi AT, Raza MW, Weir DM & Busuttil A. (1993). The potential role of bacterial toxins in sudden infant death syndrome (SIDS). *Int J Legal Med* **105**, 333-338.
- Blaustein MP & Lederer WJ. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* **79**, 763-854.

- Bolton DP, Taylor BJ, Campbell AJ, Galland BC & Cresswell C. (1993). Rebreathing expired gases from bedding: a cause of cot death? *Arch Dis Child* **69**, 187-190.
- Bonvallet R. (1987). A low threshold calcium current recorded at physiological Ca concentrations in single frog atrial cells. *Pflugers Arch* **408**, 540-542.
- Borges R, Sala F & Garcia AG. (1986). Continuous monitoring of catecholamine release from perfused cat adrenals. *J Neurosci Methods* **16**, 289-300.
- Borisovska M, Zhao Y, Tsytsyura Y, Glyvuk N, Takamori S, Matti U, Rettig J, Sudhof T & Bruns D. (2005). v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *EMBO J* **24**, 2114-2126.
- Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M & Scherbaum WA. (1997). Morphological and functional studies of the paracrine interaction between cortex and medulla in the adrenal gland. *Microsc Res Tech* **36**, 520-533.
- Bournaud R, Hidalgo J, Yu H, Girard E & Shimahara T. (2007). Catecholamine secretion from rat foetal adrenal chromaffin cells and hypoxia sensitivity. *Pflugers Arch* **454**, 83-92.
- Bournaud R, Hidalgo J, Yu H, Jaimovich E & Shimahara T. (2001). Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. *J Physiol* **537**, 35-44.
- Brandt BL, Hagiwara S, Kidokoro Y & Miyazaki S. (1976). Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J Physiol* **263**, 417-439.
- Brehm P & Eckert R. (1978). Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in Paramecium. *Science* **202**, 1203-1206.
- Brose N, Petrenko AG, Sudhof TC & Jahn R. (1992). Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* **256**, 1021-1025.
- Brown MJ, Olver RE, Ramsden CA, Strang LB & Walters DV. (1983). Effects of adrenaline and of spontaneous labour on the secretion and absorption of lung liquid in the fetal lamb. *J Physiol* **344**, 137-152.
- Bruns D & Jahn R. (2002). Molecular determinants of exocytosis. *Pflugers Arch* **443**, 333-338.

- Buckler KJ & Vaughan-Jones RD. (1994). Effects of hypercapnia on membrane potential and intracellular calcium in rat carotid body type I cells. *J Physiol* **478** (Pt 1), 157-171.
- Buckler KJ, Williams BA & Honore E. (2000). An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol* **525** Pt 1, 135-142.
- Bulenda D & Gratzl M. (1985). Matrix free Ca²⁺ in isolated chromaffin vesicles. *Biochemistry* **24**, 7760-7765.
- Buraei Z & Yang J. (2010). The ss subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Physiol Rev* **90**, 1461-1506.
- Buttigieg J, Brown S, Holloway AC & Nurse CA. (2009). Chronic nicotine blunts hypoxic sensitivity in perinatal rat adrenal chromaffin cells via upregulation of KATP channels: role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and hypoxia-inducible factor-2alpha. *J Neurosci* **29**, 7137-7147.
- Buttigieg J, Brown S, Zhang M, Lowe M, Holloway AC & Nurse CA. (2008). Chronic nicotine in utero selectively suppresses hypoxic sensitivity in neonatal rat adrenal chromaffin cells. *FASEB J* **22**, 1317-1326.
- Campbell AG, Dawes GS, Fishman AP & Hyman AI. (1967a). Pulmonary vasoconstriction and changes in heart rate during asphyxia in immature foetal lambs. *J Physiol* **192**, 93-110.
- Campbell AG, Dawes GS, Fishman AP & Hyman AI. (1967b). Regional redistribution of blood flow in the foetal lamb. *J Physiol* **191**, 120P-121P.
- Campbell KP, MacLennan DH & Jorgensen AO. (1983). Staining of the Ca²⁺-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stains-all". *J Biol Chem* **258**, 11267-11273.
- Campos-Caro A, Smillie FI, Dominguez del Toro E, Rovira JC, Vicente-Agullo F, Chapuli J, Juiz JM, Sala S, Sala F, Ballesta JJ & Criado M. (1997). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *J Neurochem* **68**, 488-497.
- Carabelli V, Marcantoni A, Comunanza V, de Luca A, Diaz J, Borges R & Carbone E. (2007). Chronic hypoxia up-regulates alpha1H T-type channels and low-

- threshold catecholamine secretion in rat chromaffin cells. *J Physiol* **584**, 149-165.
- Carafoli E. (1979). The calcium cycle of mitochondria. *FEBS Lett* **104**, 1-5.
- Carbone E & Carabelli V. (2009). O₂ sensing in chromaffin cells: new duties for T-type channels. *J Physiol* **587**, 1859-1860.
- Carbone E & Lux HD. (1984a). A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys J* **46**, 413-418.
- Carbone E & Lux HD. (1984b). A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* **310**, 501-502.
- Carbone E & Lux HD. (1987). Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones. *J Physiol* **386**, 547-570.
- Carbone E, Marcantoni A, Giaccipoli A, Guido D & Carabelli V. (2006). T-type channels-secretion coupling: evidence for a fast low-threshold exocytosis. *Pflugers Arch* **453**, 373-383.
- Cardenas AM & Marengo FD. (2010). Rapid endocytosis and vesicle recycling in neuroendocrine cells. *Cell Mol Neurobiol* **30**, 1365-1370.
- Cass A, Finkelstein A & Krespi V. (1970). The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J Gen Physiol* **56**, 100-124.
- Catterall WA. (1991). Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: a tale of two calcium channels. *Cell* **64**, 871-874.
- Catterall WA. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 521-555.
- Catterall WA. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a003947.
- Catterall WA & Few AP. (2008). Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* **59**, 882-901.

- Cavero I & Spedding M. (1983). "Calcium antagonists": a class of drugs with a bright future. Part I. Cellular calcium homeostasis and calcium as a coupling messenger. *Life Sci* **33**, 2571-2581.
- Cohen C, Perrault G, Griebel G & Soubrie P. (2005). Nicotine-associated cues maintain nicotine-seeking behavior in rats several weeks after nicotine withdrawal: reversal by the cannabinoid (CB1) receptor antagonist, rimonabant (SR141716). *Neuropsychopharmacology* **30**, 145-155.
- Cohen CJ, Spires S & Van Skiver D. (1992). Block of T-type Ca channels in guinea pig atrial cells by antiarrhythmic agents and Ca channel antagonists. *J Gen Physiol* **100**, 703-728.
- Cohn HE, Piasecki GJ, Cohen WR & Jackson BT. (1997). The adrenal secretion of catecholamines during systemic metabolic acidosis in fetal sheep. *Biol Neonate* **72**, 125-132.
- Colliver TL, Hess EJ, Pothos EN, Sulzer D & Ewing AG. (2000). Quantitative and statistical analysis of the shape of amperometric spikes recorded from two populations of cells. *J Neurochem* **74**, 1086-1097.
- Comline RS & Silver M. (1961). The release of adrenaline and noradrenaline from the adrenal glands of the foetal sheep. *J Physiol* **156**, 424-444.
- Comline RS & Silver M. (1966a). Development of activity in the adrenal medulla of the foetus and new-born animal. *Br Med Bull* **22**, 16-20.
- Comline RS & Silver M. (1966b). The development of the adrenal medulla of the foetal and new-born calf. *J Physiol* **183**, 305-340.
- Conforti L, Bodi I, Nisbet JW & Millhorn DE. (2000). O₂-sensitive K⁺ channels: role of the Kv1.2 -subunit in mediating the hypoxic response. *J Physiol* **524 Pt 3**, 783-793.
- Conforti L & Millhorn DE. (1997). Selective inhibition of a slow-inactivating voltage-dependent K⁺ channel in rat PC12 cells by hypoxia. *J Physiol* **502 (Pt 2)**, 293-305.
- Coppola T, Magnin-Luthi S, Perret-Menoud V, Gattesco S, Schiavo G & Regazzi R. (2001). Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca²⁺ channels, SNAP-25, and synaptotagmin. *J Biol Chem* **276**, 32756-32762.

- Coulter DA, Huguenard JR & Prince DA. (1989). Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons. *Ann Neurol* **25**, 582-593.
- Coupland RE. (1965). (Electron Microscopic Observations on the Structure of the Rat Adrenal Medulla. I. The Ultrastructure and Organization of Chromaffin Cells in the Normal Adrenal Medulla.). *J Anat* **99**, 231-254.
- Coupland RE & Tomlinson A. (1989). The development and maturation of adrenal medullary chromaffin cells of the rat in vivo: a descriptive and quantitative study. *Int J Dev Neurosci* **7**, 419-438.
- Creutz CE & Pollard HB. (1983). Development of a cell-free model for compound exocytosis using components of the chromaffin cell. *J Auton Nerv Syst* **7**, 13-18.
- Criado M, Dominguez del Toro E, Carrasco-Serrano C, Smillie FI, Juiz JM, Viniegra S & Ballesta JJ. (1997). Differential expression of alpha-bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic receptors in adrenergic chromaffin cells: a role for transcription factor Egr-1. *J Neurosci* **17**, 6554-6564.
- Crivellato E, Nico B & Ribatti D. (2008). The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *Anat Rec (Hoboken)* **291**, 1587-1602.
- Cross BA & Silver IA. (1962). Central activation of the sympatheticoadrenal system by hypoxia and hypercapnia. *J Endocrinol* **24**, 91-103.
- Cuchillo-Ibanez I, Lejen T, Albillos A, Rose SD, Olivares R, Villarroya M, Garcia AG & Trifaro JM. (2004). Mitochondrial calcium sequestration and protein kinase C cooperate in the regulation of cortical F-actin disassembly and secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol* **560**, 63-76.
- Cuchillo-Ibanez I, Olivares R, Aldea M, Villarroya M, Arroyo G, Fuentealba J, Garcia AG & Albillos A. (2002). Acetylcholine and potassium elicit different patterns of exocytosis in chromaffin cells when the intracellular calcium handling is disturbed. *Pflugers Arch* **444**, 133-142.
- Chan SA, Doreian B & Smith C. (2010). Dynamin and myosin regulate differential exocytosis from mouse adrenal chromaffin cells. *Cell Mol Neurobiol* **30**, 1351-1357.
- Chandy KG & Gutman GA. (1993). Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol Sci* **14**, 434.

- Cheek TR & Barry VA. (1993). Stimulus-secretion coupling in excitable cells: a central role for calcium. *J Exp Biol* **184**, 183-196.
- Chen YA & Scheller RH. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 98-106.
- Chernomordik LV, Melikyan GB & Chizmadzhev YA. (1987). Biomembrane fusion: a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* **906**, 309-352.
- Cheung CY. (1990). Fetal adrenal medulla catecholamine response to hypoxia-direct and neural components. *Am J Physiol* **258**, R1340-1346.
- Chow RH, von Ruden L & Neher E. (1992). Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* **356**, 60-63.
- Davies JN & Zamponi GW. (2008). Old proteins, developing roles: The regulation of calcium channels by synaptic proteins. *Channels (Austin)* **2**, 130-138.
- de Diego AM, Arnaiz-Cot JJ, Hernandez-Guijo JM, Gandia L & Garcia AG. (2008a). Differential variations in Ca²⁺ entry, cytosolic Ca²⁺ and membrane capacitance upon steady or action potential depolarizing stimulation of bovine chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* **194**, 97-109.
- de Diego AM, Gandia L & Garcia AG. (2008b). A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol (Oxf)* **192**, 287-301.
- de Kruijff B, Gerritsen WJ, Oerlemans A, van Dijck PW, Demel RA & van Deenen LL. (1974). Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. II. Temperature dependence of the polyene antibiotic-sterol complex formation. *Biochim Biophys Acta* **339**, 44-56.
- Dean GE, Nelson PJ & Rudnick G. (1986). Characterization of native and reconstituted hydrogen ion pumping adenosinetriphosphatase of chromaffin granules. *Biochemistry* **25**, 4918-4925.
- Delpiano MA & Hescheler J. (1989). Evidence for a PO₂-sensitive K⁺ channel in the type-I cell of the rabbit carotid body. *FEBS Lett* **249**, 195-198.

- Di Angelantonio S, Matteoni C, Fabbretti E & Nistri A. (2003). Molecular biology and electrophysiology of neuronal nicotinic receptors of rat chromaffin cells. *Eur J Neurosci* **17**, 2313-2322.
- Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H, Valladares F, Alvarez-Arguelles H & Borges R. (2008). Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* **192**, 145-163.
- Ding JP, Li ZW & Lingle CJ. (1998). Inactivating BK channels in rat chromaffin cells may arise from heteromultimeric assembly of distinct inactivation-competent and noninactivating subunits. *Biophys J* **74**, 268-289.
- Donald DE & Shepherd JT. (1980). Autonomic regulation of the peripheral circulation. *Annu Rev Physiol* **42**, 429-439.
- Doremus CG. (1907). Henri Moissan. *Science* **25**, 473-475.
- Douglas WW, Kanno T & Sampson SR. (1967a). Effects of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture. *J Physiol* **188**, 107-120.
- Douglas WW, Kanno T & Sampson SR. (1967b). Influence of the ionic environment on the membrane potential of adrenal chromaffin cells and on the depolarizing effect of acetylcholine. *J Physiol* **191**, 107-121.
- Douglas WW & Rubin RP. (1963). The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J Physiol* **167**, 288-310.
- Dry KL, Phillips JH & Dart AM. (1991). Catecholamine release from bovine adrenal chromaffin cells during anoxia or metabolic inhibition. *Circ Res* **69**, 466-474.
- Duan K, Yu X, Zhang C & Zhou Z. (2003). Control of secretion by temporal patterns of action potentials in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* **23**, 11235-11243.
- Duchen MR. (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* **529 Pt 1**, 57-68.
- Dulubova I, Lou X, Lu J, Huryeva I, Alam A, Schneggenburger R, Sudhof TC & Rizo J. (2005). A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J* **24**, 2839-2850.

- Dunlap K, Luebke JI & Turner TJ. (1995). Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci* **18**, 89-98.
- Dutt S, Matasci M, Sommer L & Zimmermann DR. (2006). Guidance of neural crest cell migration: the inhibitory function of the chondroitin sulfate proteoglycan, versican. *ScientificWorldJournal* **6**, 1114-1117.
- Eckert R & Chad JE. (1984). Inactivation of Ca channels. *Prog Biophys Mol Biol* **44**, 215-267.
- Endo M, Tanaka M & Ogawa Y. (1970). Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* **228**, 34-36.
- Engisch KL & Nowycky MC. (1996). Calcium dependence of large dense-cored vesicle exocytosis evoked by calcium influx in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* **16**, 1359-1369.
- Enyeart JJ, Biagi BA & Mlinar B. (1992). Preferential block of T-type calcium channels by neuroleptics in neural crest-derived rat and human C cell lines. *Mol Pharmacol* **42**, 364-372.
- Enyeart JJ, Mlinar B & Enyeart JA. (1993). T-type Ca²⁺ channels are required for adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by bovine adrenal zona fasciculata cells. *Mol Endocrinol* **7**, 1031-1040.
- Erickson JD, Schafer MK, Bonner TI, Eiden LE & Weihe E. (1996). Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5166-5171.
- Ermishkin LN, Kasumov KM & Potzeluyev VM. (1976). Single ionic channels induced in lipid bilayers by polyene antibiotics amphotericin B and nystatine. *Nature* **262**, 698-699.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW & Catterall WA. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25**, 533-535.
- Ertel SI & Ertel EA. (1997). Low-voltage-activated T-type Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* **18**, 37-42.

- Euler US. (1946). A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibers (sympathin) and its relations to adrenaline and noradrenaline. *Acta Physiologica Scandinavica* **12**, 73-97.
- Fabiato A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* **245**, C1-14.
- Fawcett PR. (1969). An electrophysiological study of the rat adrenal gland in vivo. *J Neurol Sci* **8**, 381-383.
- Faxelius G, Hagnevik K, Lagercrantz H, Lundell B & Irestedt L. (1983). Catecholamine surge and lung function after delivery. *Arch Dis Child* **58**, 262-266.
- Faxelius G, Lagercrantz H & Yao A. (1984). Sympathoadrenal activity and peripheral blood flow after birth: comparison in infants delivered vaginally and by cesarean section. *J Pediatr* **105**, 144-148.
- Fearon IM, Thompson RJ, Samjoo I, Vollmer C, Doering LC & Nurse CA. (2002). O₂-sensitive K⁺ channels in immortalised rat chromaffin-cell-derived MAH cells. *J Physiol* **545**, 807-818.
- Fenwick EM, Marty A & Neher E. (1982a). A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol* **331**, 577-597.
- Fenwick EM, Marty A & Neher E. (1982b). Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol* **331**, 599-635.
- Fernandez-Morales JC, Cortes-Gil L, Garcia AG & de Diego AM. (2009). Differences in the quantal release of catecholamines in chromaffin cells of rat embryos and their mothers. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**, C407-418.
- Fernando JC, Abdallah EA, Evinger M, Forray C & el-Fakahany EE. (1991). The presence of an M4 subtype muscarinic receptor in the bovine adrenal medulla revealed by mRNA and receptor binding analyses. *Eur J Pharmacol* **207**, 297-303.
- Ferraro F, Eipper BA & Mains RE. (2005). Retrieval and reuse of pituitary secretory granule proteins. *J Biol Chem* **280**, 25424-25435.
- Fisher TE & Bourque CW. (2001). The function of Ca²⁺ channel subtypes in exocytotic secretion: new perspectives from synaptic and non-synaptic release. *Prog Biophys Mol Biol* **77**, 269-303.

- Fishman MC, Greene WL & Platika D. (1985). Oxygen chemoreception by carotid body cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 1448-1450.
- Flavell SW & Greenberg ME. (2008). Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **31**, 563-590.
- Free RB, McKay SB, Gottlieb PD, Boyd RT & McKay DB. (2005). Expression of native $\alpha 3\beta 4^*$ neuronal nicotinic receptors: binding and functional studies investigating turnover of surface and intracellular receptor populations. *Mol Pharmacol* **67**, 2040-2048.
- Fujiwara N, Warashina A & Shimoji K. (1994). Characterization of low pH-induced catecholamine secretion in the rat adrenal medulla. *J Neurochem* **62**, 1809-1815.
- Fulop T, Radabaugh S & Smith C. (2005). Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* **25**, 7324-7332.
- Fulop T & Smith C. (2007). Matching native electrical stimulation by graded chemical stimulation in isolated mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci Methods* **166**, 195-202.
- Galland BC, Peebles CM, Bolton DP & Taylor BJ. (1994). The micro-environment of the sleeping newborn piglet covered by bedclothes: gas exchange and temperature. *J Paediatr Child Health* **30**, 144-150.
- Gandia L, Borges R, Albillos A & Garcia AG. (1995). Multiple calcium channel subtypes in isolated rat chromaffin cells. *Pflugers Arch* **430**, 55-63.
- Ganfornina MD & Lopez-Barneo J. (1991). Single K^+ channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O_2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2927-2930.
- Ganfornina MD & Lopez-Barneo J. (1992). Gating of O_2 -sensitive K^+ channels of arterial chemoreceptor cells and kinetic modifications induced by low PO_2 . *J Gen Physiol* **100**, 427-455.
- Ganitkevich V & Isenberg G. (1990). Contribution of two types of calcium channels to membrane conductance of single myocytes from guinea-pig coronary artery. *J Physiol* **426**, 19-42.

- Garcia-Fernandez M, Mejias R & Lopez-Barneo J. (2007). Developmental changes of chromaffin cell secretory response to hypoxia studied in thin adrenal slices. *Pflugers Arch* **454**, 93-100.
- Garcia-Sancho J & Verkhatsky A. (2008). Cytoplasmic organelles determine complexity and specificity of calcium signalling in adrenal chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* **192**, 263-271.
- Garcia AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L, Borges R & Garcia-Sancho J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* **86**, 1093-1131.
- Garcia AG, Padin F, Fernandez-Morales JC, Maroto M & Garcia-Sancho J. (2012). Cytosolic organelles shape calcium signals and exo-endocytotic responses of chromaffin cells. *Cell Calcium* **51**, 309-320.
- Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF & Sudhof TC. (1994). Synaptotagmin I: a major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* **79**, 717-727.
- Giancippoli A, Novara M, de Luca A, Baldelli P, Marcantoni A, Carbone E & Carabelli V. (2006). Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited $\text{CaV}3.2$ ($\alpha 1\text{H}$) channels in rat chromaffin cells. *Biophys J* **90**, 1830-1841.
- Gillis KD & Misler S. (1992). Single cell assay of exocytosis from pancreatic islet B cells. *Pflugers Arch* **420**, 121-123.
- Gillis KD, Mossner R & Neher E. (1996). Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. *Neuron* **16**, 1209-1220.
- Gillis KD, Pun RY & Misler S. (1991). Single cell assay of exocytosis from adrenal chromaffin cells using "perforated patch recording". *Pflugers Arch* **418**, 611-613.
- Giovannucci DR, Hlubek MD & Stuenkel EL. (1999). Mitochondria regulate the Ca^{2+} -exocytosis relationship of bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* **19**, 9261-9270.
- Gogelein H, Hartung J & Englert HC. (1999). Molecular basis, pharmacology and physiological role of cardiac $\text{K}(\text{ATP})$ channels. *Cell Physiol Biochem* **9**, 227-241.

- Gomez JF, Briosio MA, Machado JD, Sanchez JL & Borges R. (2002). New approaches for analysis of amperometrical recordings. *Ann N Y Acad Sci* **971**, 647-654.
- Gonon F, Cespuaglio R, Ponchon JL, Buda M, Jouvet M, Adams RN & Pujol JF. (1978). [In vivo continuous electrochemical determination of dopamine release in rat neostriatum]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **286**, 1203-1206.
- Gonzalez-Garcia C, Cena V, Keiser HR & Rojas E. (1993). Catecholamine secretion induced by tetraethylammonium from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* **1177**, 99-105.
- Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A & Rigual R. (1992). Oxygen and acid chemoreception in the carotid body chemoreceptors. *Trends Neurosci* **15**, 146-153.
- Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A & Rigual R. (1994). Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev* **74**, 829-898.
- Gootman N, Gootman PM, Crane LA & Buckley BJ. (1979). Integrated cardiovascular responses to combined somatic and visceral afferent stimulation in newborn piglets. *Biol Neonate* **36**, 70-77.
- Gootman PM, Buckley NM, Gootman N, Crane LA & Buckley BJ. (1978). Integrated cardiovascular responses to combined somatic afferent stimulation in newborn piglets. *Biol Neonate* **34**, 187-198.
- Grynkiewicz G, Poenie M & Tsien RY. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-3450.
- Gu X, Olson EC & Spitzer NC. (1994). Spontaneous neuronal calcium spikes and waves during early differentiation. *J Neurosci* **14**, 6325-6335.
- Gunter TE, Gunter KK, Sheu SS & Gavin CE. (1994). Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol* **267**, C313-339.
- Gunter TE & Pfeiffer DR. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* **258**, C755-786.
- Guyton AC. (1991). *Textbook of medical physiology*. Saunders, Philadelphia.

- Hagiwara N, Irisawa H & Kameyama M. (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* **395**, 233-253.
- Hagiwara S & Byerly L. (1981). Calcium channel. *Annu Rev Neurosci* **4**, 69-125.
- Hagiwara S & Nakajima S. (1966). Effects of the intracellular Ca ion concentration upon the excitability of the muscle fiber membrane of a barnacle. *J Gen Physiol* **49**, 807-818.
- Hagiwara S, Ozawa S & Sand O. (1975). Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* **65**, 617-644.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B & Sigworth FJ. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100.
- Han X, Wang CT, Bai J, Chapman ER & Jackson MB. (2004). Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Science* **304**, 289-292.
- Harata NC, Aravanis AM & Tsien RW. (2006). Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *J Neurochem* **97**, 1546-1570.
- Heinemann C, Chow RH, Neher E & Zucker RS. (1994). Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca²⁺. *Biophys J* **67**, 2546-2557.
- Hernandez-Guijo JM, Maneu-Flores VE, Ruiz-Nuno A, Villarroja M, Garcia AG & Gandia L. (2001). Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca²⁺ channels in chromaffin cells: role of mitochondria. *J Neurosci* **21**, 2553-2560.
- Herrington J, Park YB, Babcock DF & Hille B. (1996). Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca²⁺ loads from rat adrenal chromaffin cells. *Neuron* **16**, 219-228.
- Hess P. (1990). Calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Neurosci* **13**, 337-356.
- Hille B. (2011). *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

- Hirano T. (1982). Neural regulation of adrenal chromaffin cell function in the mouse--stress effect on the distribution of [3H]dopamine in denervated adrenal medulla. *Brain Res* **238**, 45-54.
- Hodgkin AL & Huxley AF. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* **117**, 500-544.
- Hodgman JE & Hoppenbrouwers T. (1988). Home monitoring for the sudden infant death syndrome. The case against. *Ann N Y Acad Sci* **533**, 164-175.
- Holz RW, Bittner MA, Peppers SC, Senter RA & Eberhard DA. (1989). MgATP-independent and MgATP-dependent exocytosis. Evidence that MgATP primes adrenal chromaffin cells to undergo exocytosis. *J Biol Chem* **264**, 5412-5419.
- Hollins B & Ikeda SR. (1996). Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurophysiol* **76**, 1195-1211.
- Horrigan FT & Bookman RJ. (1994). Releasable pools and the kinetics of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Neuron* **13**, 1119-1129.
- Huang L, Keyser BM, Tagmose TM, Hansen JB, Taylor JT, Zhuang H, Zhang M, Ragsdale DS & Li M. (2004). NNC 55-0396 [(1S,2S)-2-(2-(N-[(3-benzimidazol-2-yl)propyl]-N-methylamino)ethyl)-6-fluoro-1,2, 3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl cyclopropanecarboxylate dihydrochloride]: a new selective inhibitor of T-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* **309**, 193-199.
- Hur EM, Park YS, Huh YH, Yoo SH, Woo KC, Choi BH & Kim KT. (2005). Junctional membrane inositol 1,4,5-trisphosphate receptor complex coordinates sensitization of the silent EGF-induced Ca²⁺ signaling. *J Cell Biol* **169**, 657-667.
- Iijima T, Matsumoto G & Kidokoro Y. (1992). Synaptic activation of rat adrenal medulla examined with a large photodiode array in combination with a voltage-sensitive dye. *Neuroscience* **51**, 211-219.
- Inoue M, Fujishiro N & Imanaga I. (1999). Na⁺ pump inhibition and non-selective cation channel activation by cyanide and anoxia in guinea-pig chromaffin cells. *J Physiol* **519 Pt 2**, 385-396.
- Inoue M, Harada K, Matsuoka H, Sata T & Warashina A. (2008). Inhibition of TASK1-like channels by muscarinic receptor stimulation in rat adrenal medullary cells. *J Neurochem* **106**, 1804-1814.

- Inoue M & Imanaga I. (1993). G protein-mediated inhibition of inwardly rectifying K⁺ channels in guinea pig chromaffin cells. *Am J Physiol* **265**, C946-956.
- Iturriaga R & Lahiri S. (1991). Carotid body chemoreception in the absence and presence of CO₂-HCO₃. *Brain Res* **568**, 253-260.
- Jahn R, Lang T & Sudhof TC. (2003). Membrane fusion. *Cell* **112**, 519-533.
- Jahn R & Sudhof TC. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 863-911.
- Jarvis SE & Zamponi GW. (2005). Masters or slaves? Vesicle release machinery and the regulation of presynaptic calcium channels. *Cell Calcium* **37**, 483-488.
- Jarvis SE & Zamponi GW. (2007). Trafficking and regulation of neuronal voltage-gated calcium channels. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 474-482.
- Jensen A, Roman C & Rudolph AM. (1991). Effects of reducing uterine blood flow on fetal blood flow distribution and oxygen delivery. *J Dev Physiol* **15**, 309-323.
- Jones CT, Roebuck MM, Walker DW & Johnston BM. (1988). The role of the adrenal medulla and peripheral sympathetic nerves in the physiological responses of the fetal sheep to hypoxia. *J Dev Physiol* **10**, 17-36.
- Jones HM, Cummings AJ, Setchell KD & Lawson AM. (1979). A study of the disposition of alpha-methyldopa in newborn infants following its administration to the mother for the treatment of hypertension during pregnancy. *Br J Clin Pharmacol* **8**, 433-440.
- Keating DJ, Rychkov GY & Roberts ML. (2001). Oxygen sensitivity in the sheep adrenal medulla: role of SK channels. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1434-1441.
- Keating DJ, Rychkov GY & Roberts ML. (2009). The contribution of voltage-gated Ca²⁺ currents to K⁺ channel activation during ovine adrenal chromaffin cell development. *Int J Dev Neurosci* **27**, 357-363.
- Kelly DH, Golub H, Carley D & Shannon DC. (1986). Pneumograms in infants who subsequently died of sudden infant death syndrome. *J Pediatr* **109**, 249-254.

- Kemp JS, Kowalski RM, Burch PM, Graham MA & Thach BT. (1993). Unintentional suffocation by rebreathing: a death scene and physiologic investigation of a possible cause of sudden infant death. *J Pediatr* **122**, 874-880.
- Kibble AV, Barnard RJ & Burgoyne RD. (1996). Patch-clamp capacitance analysis of the effects of alpha-SNAP on exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Cell Sci* **109** (Pt 9), 2417-2422.
- Kidokoro Y, Miyazaki S & Ozawa S. (1982). Acetylcholine-induced membrane depolarization and potential fluctuations in the rat adrenal chromaffin cell. *J Physiol* **324**, 203-220.
- Kidokoro Y & Ritchie AK. (1980). Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J Physiol* **307**, 199-216.
- Kim SJ, Lim W & Kim J. (1995). Contribution of L- and N-type calcium currents to exocytosis in rat adrenal medullary chromaffin cells. *Brain Res* **675**, 289-296.
- Korn SJ & Horn R. (1989). Influence of sodium-calcium exchange on calcium current rundown and the duration of calcium-dependent chloride currents in pituitary cells, studied with whole cell and perforated patch recording. *J Gen Physiol* **94**, 789-812.
- Koval LM, Yavorskaya EN & Lukyanetz EA. (2001). Electron microscopic evidence for multiple types of secretory vesicles in bovine chromaffin cells. *Gen Comp Endocrinol* **121**, 261-277.
- Krous HF, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T, Cutz E, Hanzlick R, Keens TG & Mitchell EA. (2004). Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* **114**, 234-238.
- Kuga T, Sadoshima J, Tomoike H, Kanaide H, Akaike N & Nakamura M. (1990). Actions of Ca²⁺ antagonists on two types of Ca²⁺ channels in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *Circ Res* **67**, 469-480.
- Lagercrantz H & Bistoletti P. (1977). Catecholamine release in the newborn infant at birth. *Pediatr Res* **11**, 889-893.
- Lagercrantz H, Peyronnet J, Yuan SZ & Tang LQ. (2001). Catecholamines, hypoxic defence and the neonatal brain. *Dev Med Child Neurol Suppl* **86**, 28-29.

- Lagercrantz H & Slotkin TA. (1986). The "stress" of being born. *Sci Am* **254**, 100-107.
- Lara B, Gandia L, Martinez-Sierra R, Torres A & Garcia AG. (1998). Q-type Ca^{2+} channels are located closer to secretory sites than L-type channels: functional evidence in chromaffin cells. *Pflugers Arch* **435**, 472-478.
- Lara B, Zapater P, Montiel C, de la Fuente MT, Martinez-Sierra R, Ballesta JJ, Gandia L & Garcia AG. (1995). Density of apamin-sensitive Ca^{2+} -dependent K^{+} channels in bovine chromaffin cells: relevance to secretion. *Biochem Pharmacol* **49**, 1459-1468.
- Le Douarin NM. (2008). Developmental patterning deciphered in avian chimeras. *Dev Growth Differ* **50 Suppl 1**, S11-28.
- Lee J, Lim W, Eun SY, Kim SJ & Kim J. (2000a). Inhibition of apamin-sensitive K^{+} current by hypoxia in adult rat adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch* **439**, 700-704.
- Lee SH, Schwaller B & Neher E. (2000b). Kinetics of Ca^{2+} binding to parvalbumin in bovine chromaffin cells: implications for $[\text{Ca}^{2+}]$ transients of neuronal dendrites. *J Physiol* **525 Pt 2**, 419-432.
- Lesage F & Lazdunski M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**, F793-801.
- Leszczyszyn DJ, Jankowski JA, Viveros OH, Diliberto EJ, Jr., Near JA & Wightman RM. (1990). Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells. Chemical evidence for exocytosis. *J Biol Chem* **265**, 14736-14737.
- Leszczyszyn DJ, Jankowski JA, Viveros OH, Diliberto EJ, Jr., Near JA & Wightman RM. (1991). Secretion of catecholamines from individual adrenal medullary chromaffin cells. *J Neurochem* **56**, 1855-1863.
- Levitsky KL & Lopez-Barneo J. (2009). Developmental change of T-type Ca^{2+} channel expression and its role in rat chromaffin cell responsiveness to acute hypoxia. *J Physiol* **587**, 1917-1929.
- Lewis AB & Sadeghi M. (1987). Acidemia potentiates the plasma catecholamine response to hypoxemia in fetal sheep. *Biol Neonate* **52**, 285-291.

- Lewis RV, Stern AS, Rossier J, Stein S & Udenfriend S. (1979). Putative enkephalin precursors in bovine adrenal medulla. *Biochem Biophys Res Commun* **89**, 822-829.
- Lin CG, Lin YC, Liu HW & Kao LS. (1997). Characterization of Rab3A, Rab3B and Rab3C: different biochemical properties and intracellular localization in bovine chromaffin cells. *Biochem J* **324** (Pt 1), 85-90.
- Lindau M & Neher E. (1988). Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflugers Arch* **411**, 137-146.
- Lingle CJ, Solaro CR, Prakriya M & Ding JP. (1996). Calcium-activated potassium channels in adrenal chromaffin cells. *Ion Channels* **4**, 261-301.
- Lipton AJ, Johnson MA, Macdonald T, Lieberman MW, Gozal D & Gaston B. (2001). S-nitrosothiols signal the ventilatory response to hypoxia. *Nature* **413**, 171-174.
- Liss B & Roeper J. (2001). Molecular physiology of neuronal K-ATP channels (review). *Mol Membr Biol* **18**, 117-127.
- Liu QY, Karpinski E, Rao MR & Pang PK. (1991). Tetrandrine: a novel calcium channel antagonist inhibits type I calcium channels in neuroblastoma cells. *Neuropharmacology* **30**, 1325-1331.
- Liu Y, Holmgren M, Jurman ME & Yellen G. (1997). Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron* **19**, 175-184.
- Livett BG. (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev* **64**, 1103-1161.
- Livett BG & Marley PD. (1993). Noncholinergic control of adrenal catecholamine secretion. *J Anat* **183** (Pt 2), 277-289.
- Lomax RB, Michelena P, Nunez L, Garcia-Sancho J, Garcia AG & Montiel C. (1997). Different contributions of L- and Q-type Ca²⁺ channels to Ca²⁺ signals and secretion in chromaffin cell subtypes. *Am J Physiol* **272**, C476-484.
- Lopez-Barneo J. (2003). Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 493-499.

- Lopez-Barneo J, Lopez-Lopez JR, Urena J & Gonzalez C. (1988). Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science* **241**, 580-582.
- Lopez-Barneo J, Ortega-Saenz P, Piruat JI & Garcia-Fernandez M. (2006). Oxygen-sensing by ion channels and mitochondrial function in carotid body glomus cells. *Novartis Found Symp* **272**, 54-64; discussion 64-72, 131-140.
- Lopez-Barneo J, Pardal R & Ortega-Saenz P. (2001). Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol* **63**, 259-287.
- Lopez-Lopez J, Gonzalez C, Urena J & Lopez-Barneo J. (1989). Low pO₂ selectively inhibits K channel activity in chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. *J Gen Physiol* **93**, 1001-1015.
- Lopez MG, Albillos A, de la Fuente MT, Borges R, Gandia L, Carbone E, Garcia AG & Artalejo AR. (1994). Localized L-type calcium channels control exocytosis in cat chromaffin cells. *Pflugers Arch* **427**, 348-354.
- Lovell PV, King JT & McCobb DP. (2004). Acute modulation of adrenal chromaffin cell BK channel gating and cell excitability by glucocorticoids. *J Neurophysiol* **91**, 561-570.
- Lovell PV & McCobb DP. (2001). Pituitary control of BK potassium channel function and intrinsic firing properties of adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* **21**, 3429-3442.
- Lukyanetz EA & Neher E. (1999). Different types of calcium channels and secretion from bovine chromaffin cells. *Eur J Neurosci* **11**, 2865-2873.
- Llinas R, Sugimori M, Hillman DE & Cherksey B. (1992). Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca²⁺ channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci* **15**, 351-355.
- Llinas R & Yarom Y. (1981). Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurones in vitro. *J Physiol* **315**, 569-584.
- MacKinnon R. (1991). New insights into the structure and function of potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* **1**, 14-19.

- Machado DJ, Montesinos MS & Borges R. (2008). Good practices in single-cell amperometry. *Methods Mol Biol* **440**, 297-313.
- Marengo FD & Monck JR. (2000). Development and dissipation of Ca(2+) gradients in adrenal chromaffin cells. *Biophys J* **79**, 1800-1820.
- Marengo FD & Monck JR. (2003). Spatial distribution of Ca(2+) signals during repetitive depolarizing stimuli in adrenal chromaffin cells. *Biophys J* **85**, 3397-3417.
- Markin VS & Kozlov MM. (1983). [Primary event in the process of membrane fusion]. *Biofizika* **28**, 72-77.
- Marmont G. (1949). Studies on the axon membrane; a new method. *J Cell Physiol* **34**, 351-382.
- Mathiasen D, Rossum LM, Robinson IM, Burgoyne RD, East JM, Moller M, Rasmussen HN & Treiman M. (1993). Isolation of chromaffin cell thapsigargin-sensitive Ca²⁺ store in light microsomes from bovine adrenal medulla. *Int J Biochem* **25**, 641-652.
- Matsuda H. (1991). Magnesium gating of the inwardly rectifying K⁺ channel. *Annu Rev Physiol* **53**, 289-298.
- Matthews EK. (1967). Membrane potential measurement in cells of the adrenal gland. *J Physiol* **189**, 139-148.
- McDonald DM & Mitchell RA. (1981). The neural pathway involved in "efferent inhibition" of chemoreceptors in the cat carotid body. *J Comp Neurol* **201**, 457-476.
- Micheletti M, Brioschi A, Fesce R & Grohovaz F. (2005). A novel pattern of fast calcium oscillations points to calcium and electrical activity cross-talk in rat chromaffin cells. *Cell Mol Life Sci* **62**, 95-104.
- Minami K, Miki T, Kadowaki T & Seino S. (2004). Roles of ATP-sensitive K⁺ channels as metabolic sensors: studies of Kir6.x null mice. *Diabetes* **53 Suppl 3**, S176-180.
- Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP & Adams ME. (1992). P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature* **355**, 827-829.

- Mishra SK & Hermesmeyer K. (1994). Selective inhibition of T-type Ca^{2+} channels by Ro 40-5967. *Circ Res* **75**, 144-148.
- Mlinar B, Biagi BA & Enyeart JJ. (1993). Voltage-gated transient currents in bovine adrenal fasciculata cells. I. T-type Ca^{2+} current. *J Gen Physiol* **102**, 217-237.
- Mochida S, Westenbroek RE, Yokoyama CT, Zhong H, Myers SJ, Scheuer T, Itoh K & Catterall WA. (2003). Requirement for the synaptic protein interaction site for reconstitution of synaptic transmission by P/Q-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2819-2824.
- Mochizuki-Oda N, Takeuchi Y, Matsumura K, Oosawa Y & Watanabe Y. (1997). Hypoxia-induced catecholamine release and intracellular Ca^{2+} increase via suppression of K^{+} channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* **69**, 377-387.
- Mojet MH, Mills E & Duchen MR. (1997). Hypoxia-induced catecholamine secretion in isolated newborn rat adrenal chromaffin cells is mimicked by inhibition of mitochondrial respiration. *J Physiol* **504** (Pt 1), 175-189.
- Montero M, Alonso MT, Albillos A, Garcia-Sancho J & Alvarez J. (2001). Mitochondrial Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mediated by the Ca^{2+} uniporter. *Mol Biol Cell* **12**, 63-71.
- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, Garcia-Sancho J & Alvarez J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* **2**, 57-61.
- Montero M, Brini M, Marsault R, Alvarez J, Sitia R, Pozzan T & Rizzuto R. (1995). Monitoring dynamic changes in free Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. *EMBO J* **14**, 5467-5475.
- Montiel C, Lopez MG, Sanchez-Garcia P, Maroto R, Zapater P & Garcia AG. (1995). Contribution of SK and BK channels in the control of catecholamine release by electrical stimulation of the cat adrenal gland. *J Physiol* **486** (Pt 2), 427-437.
- Montoro RJ, Urena J, Fernandez-Chacon R, Alvarez de Toledo G & Lopez-Barneo J. (1996). Oxygen sensing by ion channels and chemotransduction in single glomus cells. *J Gen Physiol* **107**, 133-143.

- Morad M, Davies NW, Kaplan JH & Lux HD. (1988). Inactivation and block of calcium channels by photo-released Ca^{2+} in dorsal root ganglion neurons. *Science* **241**, 842-844.
- Moro MA, De Alba J, Leza JC, Lorenzo P, Fernandez AP, Bentura ML, Bosca L, Rodrigo J & Lizasoain I. (1998). Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur J Neurosci* **10**, 445-456.
- Moro MA, Lopez MG, Gandia L, Michelena P & Garcia AG. (1990). Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal Biochem* **185**, 243-248.
- Moser T & Neher E. (1997). Estimation of mean exocytic vesicle capacitance in mouse adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6735-6740.
- Mosharov EV & Sulzer D. (2005). Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nat Methods* **2**, 651-658.
- Mousavi M, Hellstrom-Lindahl E, Guan ZZ, Bednar I & Nordberg A. (2001). Expression of nicotinic acetylcholine receptors in human and rat adrenal medulla. *Life Sci* **70**, 577-590.
- Movafagh S & Morad M. (2010). L-type calcium channel as a cardiac oxygen sensor. *Ann N Y Acad Sci* **1188**, 153-158.
- Mozhayeva MG, Sara Y, Liu X & Kavalali ET. (2002). Development of vesicle pools during maturation of hippocampal synapses. *J Neurosci* **22**, 654-665.
- Munoz-Cabello AM, Toledo-Aral JJ, Lopez-Barneo J & Echevarria M. (2005). Rat adrenal chromaffin cells are neonatal CO_2 sensors. *J Neurosci* **25**, 6631-6640.
- Nargeot J. (1992). [Functional expression of calcium channels in reconstitution models]. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* **100**, A25-26.
- Nassar-Gentina V, Pollard HB & Rojas E. (1988). Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland. *Am J Physiol* **254**, C675-683.
- Neely A & Lingle CJ. (1992). Two components of calcium-activated potassium current in rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol* **453**, 97-131.

- Neher E. (1998a). Usefulness and limitations of linear approximations to the understanding of Ca^{++} signals. *Cell Calcium* **24**, 345-357.
- Neher E. (1998b). Vesicle pools and Ca^{2+} microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* **20**, 389-399.
- Neher E & Augustine GJ. (1992). Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J Physiol* **450**, 273-301.
- Neher E & Marty A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 6712-6716.
- Neher E & Sakmann B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802.
- Neher E & Zucker RS. (1993). Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* **10**, 21-30.
- Nelson EA, Taylor BJ & Weatherall IL. (1989). Sleeping position and infant bedding may predispose to hyperthermia and the sudden infant death syndrome. *Lancet* **1**, 199-201.
- Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen X, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, Loo JA, Dooley DJ, Nadasdi L, Tsien RW, Lemos J & Miljanich G. (1998). Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* **37**, 15353-15362.
- Nili U, de Wit H, Gulyas-Kovacs A, Toonen RF, Sorensen JB, Verhage M & Ashery U. (2006). Munc18-1 phosphorylation by protein kinase C potentiates vesicle pool replenishment in bovine chromaffin cells. *Neuroscience* **143**, 487-500.
- Nilius B, Hess P, Lansman JB & Tsien RW. (1985). A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* **316**, 443-446.
- Norris JR & Jensen HL. (1957). Calcium requirements of *Azotobacter*. *Nature* **180**, 1493-1494.
- Novara M, Baldelli P, Cavallari D, Carabelli V, Giancippoli A & Carbone E. (2004). Exposure to cAMP and beta-adrenergic stimulation recruits Ca(V)_3 T-type

- channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins. *J Physiol* **558**, 433-449.
- Nowycky MC, Fox AP & Tsien RW. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**, 440-443.
- Nudler S, Piriz J, Urbano FJ, Rosato-Siri MD, Renteria ES & Uchitel OD. (2003). Ca²⁺ channels and synaptic transmission at the adult, neonatal, and P/Q-type deficient neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci* **998**, 11-17.
- O'Connor DT & Frigon RP. (1984). Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle soluble protein. Multiple size forms, subcellular storage, and regional distribution in chromaffin and nervous tissue elucidated by radioimmunoassay. *J Biol Chem* **259**, 3237-3247.
- O'Sullivan AJ, Cheek TR, Moreton RB, Berridge MJ & Burgoyne RD. (1989). Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cells from video imaging of fura-2. *EMBO J* **8**, 401-411.
- Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J & Adams ME. (1994). Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem* **63**, 823-867.
- Olivos L & Artalejo AR. (2008). Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* **192**, 213-220.
- Olver RE, Ramsden CA, Strang LB & Walters DV. (1986). The role of amiloride-blockable sodium transport in adrenaline-induced lung liquid reabsorption in the fetal lamb. *J Physiol* **376**, 321-340.
- Olver RE & Walters DV. (1977). The effect of catecholamines on foetal lung liquid secretion [proceedings]. *J Physiol* **273**, 58P-59P.
- Olver RE, Walters DV & S MW. (2004). Developmental regulation of lung liquid transport. *Annu Rev Physiol* **66**, 77-101.
- Orozco C, Garcia-de-Diego AM, Arias E, Hernandez-Guijo JM, Garcia AG, Villarroya M & Lopez MG. (2006). Depolarization preconditioning produces cytoprotection against veratridine-induced chromaffin cell death. *Eur J Pharmacol* **553**, 28-38.

- Pan CY & Kao LS. (1997). Catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells: the role of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger and the intracellular Ca²⁺ pool. *J Neurochem* **69**, 1085-1092.
- Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN & Jan LY. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* **237**, 749-753.
- Papazian DM, Shao XM, Seoh SA, Mock AF, Huang Y & Wainstock DH. (1995). Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K⁺ channel. *Neuron* **14**, 1293-1301.
- Papazian DM, Timpe LC, Jan YN & Jan LY. (1991). Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* **349**, 305-310.
- Pappano AJ. (1977). Ontogenetic development of autonomic neuroeffector transmission and transmitter reactivity in embryonic and fetal hearts. *Pharmacol Rev* **29**, 3-33.
- Pardal R & Lopez-Barneo J. (2002). Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nat Neurosci* **5**, 197-198.
- Park YB. (1994). Ion selectivity and gating of small conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol* **481** (Pt 3), 555-570.
- Park YB, Herrington J, Babcock DF & Hille B. (1996). Ca²⁺ clearance mechanisms in isolated rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol* **492** (Pt 2), 329-346.
- Patel AJ, Honore E, Lesage F, Fink M, Romey G & Lazdunski M. (1999). Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat Neurosci* **2**, 422-426.
- Perez-Reyes E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* **83**, 117-161.
- Perez-Reyes E. (2006). Molecular characterization of T-type calcium channels. *Cell Calcium* **40**, 89-96.
- Perin MS, Fried VA, Mignery GA, Jahn R & Sudhof TC. (1990). Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* **345**, 260-263.

- Petersen CC, Petersen OH & Berridge MJ. (1993). The role of endoplasmic reticulum calcium pumps during cytosolic calcium spiking in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* **268**, 22262-22264.
- Pevsner J, Hsu SC, Braun JE, Calakos N, Ting AE, Bennett MK & Scheller RH. (1994). Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron* **13**, 353-361.
- Pitta TP, Sherwood EE, Kobel AM & Berg HC. (1997). Calcium is required for swimming by the nonflagellated cyanobacterium *Synechococcus* strain WH8113. *J Bacteriol* **179**, 2524-2528.
- Poets CF, von Bodman A & Urschitz MS. (2003). [Empiricism or evidence in pediatric sleep medicine]. *Wien Klin Wochenschr* **115**, 853-854.
- Pongs O. (1992). Structural basis of voltage-gated K⁺ channel pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **13**, 359-365.
- Poulsen JC, Caspersen C, Mathiasen D, East JM, Tunwell RE, Lai FA, Maeda N, Mikoshiba K & Treiman M. (1995). Thapsigargin-sensitive Ca²⁺-ATPases account for Ca²⁺ uptake to inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and caffeine-sensitive Ca²⁺ stores in adrenal chromaffin cells. *Biochem J* **307** (Pt 3), 749-758.
- Prakriya M & Lingle CJ. (1999). BK channel activation by brief depolarizations requires Ca²⁺ influx through L- and Q-type Ca²⁺ channels in rat chromaffin cells. *J Neurophysiol* **81**, 2267-2278.
- Pravettoni E, Bacci A, Coco S, Forbicini P, Matteoli M & Verderio C. (2000). Different localizations and functions of L-type and N-type calcium channels during development of hippocampal neurons. *Dev Biol* **227**, 581-594.
- Purves D, GJA, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel & LaMantia JOM, Leonard E. White. (2004). Neuroscience 3ra edición. *Sinauer Associates, Inc Massachusetts USA*.
- Putnam RW, Filosa JA & Ritucci NA. (2004). Cellular mechanisms involved in CO(2) and acid signaling in chemosensitive neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C1493-1526.
- Rajapaksha WR, Wang D, Davies JN, Chen L, Zamponi GW & Fisher TE. (2008). Novel splice variants of rat CaV2.1 that lack much of the synaptic protein

- interaction site are expressed in neuroendocrine cells. *J Biol Chem* **283**, 15997-16003.
- Randall A & Tsien RW. (1995). Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* **15**, 2995-3012.
- Rettig J, Heinemann C, Ashery U, Sheng ZH, Yokoyama CT, Catterall WA & Neher E. (1997). Alteration of Ca²⁺ dependence of neurotransmitter release by disruption of Ca²⁺ channel/syntaxin interaction. *J Neurosci* **17**, 6647-6656.
- Rettig J, Sheng ZH, Kim DK, Hodson CD, Snutch TP & Catterall WA. (1996). Isoform-specific interaction of the $\alpha 1A$ subunits of brain Ca²⁺ channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7363-7368.
- Reuter H. (1979). Properties of two inward membrane currents in the heart. *Annu Rev Physiol* **41**, 413-424.
- Reynafarje B & Lehninger AL. (1977). Electric charge stoichiometry of calcium translocation in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **77**, 1273-1279.
- Rico AJ, Prieto-Lloret J, Gonzalez C & Rigual R. (2005). Hypoxia and acidosis increase the secretion of catecholamines in the neonatal rat adrenal medulla: an in vitro study. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C1417-1425.
- Richardson BS, Carmichael L, Homan J, Johnston L & Gagnon R. (1996). Fetal cerebral, circulatory, and metabolic responses during heart rate decelerations with umbilical cord compression. *Am J Obstet Gynecol* **175**, 929-936.
- Richardson DB, Wing S, Lorey F & Hertz-Picciotto I. (2004). Adult hemoglobin levels at birth and risk of sudden infant death syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med* **158**, 366-371.
- Rigual R, Gonzalez E, Gonzalez C & Fidone S. (1986). Synthesis and release of catecholamines by the cat carotid body in vitro: effects of hypoxic stimulation. *Brain Res* **374**, 101-109.
- Rigual R, Montero M, Rico AJ, Prieto-Lloret J, Alonso MT & Alvarez J. (2002). Modulation of secretion by the endoplasmic reticulum in mouse chromaffin cells. *Eur J Neurosci* **16**, 1690-1696.

- Ringer S. (1883). A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol* **4**, 29-42 23.
- Rocher A, Obeso A, Gonzalez C & Herreros B. (1991). Ionic mechanisms for the transduction of acidic stimuli in rabbit carotid body glomus cells. *J Physiol* **433**, 533-548.
- Rorsman P. (1988). Two types of Ca²⁺ currents with different sensitivities to organic Ca²⁺ channel antagonists in guinea pig pancreatic alpha 2 cells. *J Gen Physiol* **91**, 243-254.
- Rose RK, Dibdin GH & Shellis RP. (1993). A quantitative study of calcium binding and aggregation in selected oral bacteria. *J Dent Res* **72**, 78-84.
- Rosenthal RN & Slotkin TA. (1977). Development of nicotinic responses in the rat adrenal medulla and long-term effects of neonatal nicotine administration. *Br J Pharmacol* **60**, 59-64.
- Rossier MF. (1997). Confinement of intracellular calcium signaling in secretory and steroidogenic cells. *Eur J Endocrinol* **137**, 317-325.
- Rossier MF, Python CP, Capponi AM, Schlegel W, Kwan CY & Vallotton MB. (1993). Blocking T-type calcium channels with tetrandrine inhibits steroidogenesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* **132**, 1035-1043.
- Rychkov GY, Adams MB, McMillen IC & Roberts ML. (1998). Oxygen-sensing mechanisms are present in the chromaffin cells of the sheep adrenal medulla before birth. *J Physiol* **509** (Pt 3), 887-893.
- Sala F, Nistri A & Criado M. (2008). Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* **192**, 203-212.
- Salman S, Brown ST & Nurse CA. (2012). Chronic nicotine induces hypoxia inducible factor-2alpha in perinatal rat adrenal chromaffin cells: role in transcriptional upregulation of KATP channel subunit Kir6.2. *Am J Physiol Cell Physiol* **302**, C1531-1538.
- Sanchez D, Lopez-Lopez JR, Perez-Garcia MT, Sanz-Alfayate G, Obeso A, Ganfornina MD & Gonzalez C. (2002). Molecular identification of K_valpha subunits that contribute to the oxygen-sensitive K⁺ current of chemoreceptor cells of the rabbit carotid body. *J Physiol* **542**, 369-382.

- Santodomingo J, Vay L, Camacho M, Hernandez-Sanmiguel E, Fonteriz RI, Lobaton CD, Montero M, Moreno A & Alvarez J. (2008). Calcium dynamics in bovine adrenal medulla chromaffin cell secretory granules. *Eur J Neurosci* **28**, 1265-1274.
- Sassa T, Harada S, Ogawa H, Rand JB, Maruyama IN & Hosono R. (1999). Regulation of the UNC-18-Caenorhabditis elegans syntaxin complex by UNC-13. *J Neurosci* **19**, 4772-4777.
- Sato M, Ikeda K, Yoshizaki K & Koyano H. (1991). Response of cytosolic calcium to anoxia and cyanide in cultured glomus cells of newborn rabbit carotid body. *Brain Res* **551**, 327-330.
- Scheibner V. (2003). Response to Leask and McIntyre's attack on myself as a public opponent of vaccination. *Vaccine* **22**, vi-ix.
- Schluter OM, Khvotchev M, Jahn R & Sudhof TC. (2002). Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion. *J Biol Chem* **277**, 40919-40929.
- Schneider H. (2001). [Birth asphyxia - an unsolved problem of perinatal medicine]. *Z Geburtshilfe Neonatol* **205**, 205-212.
- Schoch S & Gundelfinger ED. (2006). Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res* **326**, 379-391.
- Schwartz PJ. (1976). Cardiac sympathetic innervation and the sudden infant death syndrome. A possible pathogenetic link. *Am J Med* **60**, 167-172.
- Seidler FJ & Slotkin TA. (1985). Adrenomedullary function in the neonatal rat: responses to acute hypoxia. *J Physiol* **358**, 1-16.
- Seidler FJ & Slotkin TA. (1986). Ontogeny of adrenomedullary responses to hypoxia and hypoglycemia: role of splanchnic innervation. *Brain Res Bull* **16**, 11-14.
- Sheng ZH, Westenbroek RE & Catterall WA. (1998). Physical link and functional coupling of presynaptic calcium channels and the synaptic vesicle docking/fusion machinery. *J Bioenerg Biomembr* **30**, 335-345.
- Silinsky EM. (2008). Selective disruption of the mammalian secretory apparatus enhances or eliminates calcium current modulation in nerve endings. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6427-6432.

- Slotkin TA. (1973a). Maturation of the adrenal medulla. I. Uptake and storage of amines in isolated storage vesicles of the rat. *Biochem Pharmacol* **22**, 2023-2032.
- Slotkin TA. (1973b). Maturation of the adrenal medulla. II. Content and properties of catecholamine storage vesicles of the rat. *Biochem Pharmacol* **22**, 2033-2044.
- Slotkin TA, Lorber BA, McCook EC, Barnes GA & Seidler FJ. (1995). Neural input and the development of adrenergic intracellular signaling: neonatal denervation evokes neither receptor upregulation nor persistent supersensitivity of adenylate cyclase. *Brain Res Dev Brain Res* **88**, 17-29.
- Slotkin TA & Seidler FJ. (1988). Adrenomedullary catecholamine release in the fetus and newborn: secretory mechanisms and their role in stress and survival. *J Dev Physiol* **10**, 1-16.
- Slotkin TA, Zhang J, McCook EC & Seidler FJ. (1998). Glucocorticoid-targeting of the adenylyl cyclase signaling pathway in the cerebellum of young vs. aged rats. *Brain Res* **800**, 236-244.
- Snyders DJ. (1999). Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* **42**, 377-390.
- Sokolov S, Weiss RG, Timin EN & Hering S. (2000). Modulation of slow inactivation in class A Ca²⁺ channels by beta-subunits. *J Physiol* **527 Pt 3**, 445-454.
- Solaro CR, Ding JP, Li ZW & Lingle CJ. (1997). The cytosolic inactivation domains of BK_i channels in rat chromaffin cells do not behave like simple, open-channel blockers. *Biophys J* **73**, 819-830.
- Solaro CR & Lingle CJ. (1992). Trypsin-sensitive, rapid inactivation of a calcium-activated potassium channel. *Science* **257**, 1694-1698.
- Solaro CR, Prakriya M, Ding JP & Lingle CJ. (1995). Inactivating and noninactivating Ca(2+)- and voltage-dependent K⁺ current in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* **15**, 6110-6123.
- Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH & Rothman JE. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* **75**, 409-418.

- Sorensen JB. (2004). Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflugers Arch* **448**, 347-362.
- Sorensen JB. (2009). Conflicting views on the membrane fusion machinery and the fusion pore. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 513-537.
- Sorensen JB, Nagy G, Varoqueaux F, Nehring RB, Brose N, Wilson MC & Neher E. (2003). Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* **114**, 75-86.
- Sorensen JB, Wiederhold K, Muller EM, Milosevic I, Nagy G, de Groot BL, Grubmuller H & Fasshauer D. (2006). Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles. *EMBO J* **25**, 955-966.
- Souvannakitti D, Kuri B, Yuan G, Pawar A, Kumar GK, Smith C, Fox AP & Prabhakar NR. (2010). Neonatal intermittent hypoxia impairs neuronal nicotinic receptor expression and function in adrenal chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**, C381-388.
- Stea A & Nurse CA. (1991). Whole-cell and perforated-patch recordings from O₂-sensitive rat carotid body cells grown in short- and long-term culture. *Pflugers Arch* **418**, 93-101.
- Stein A, Radhakrishnan A, Riedel D, Fasshauer D & Jahn R. (2007). Synaptotagmin activates membrane fusion through a Ca²⁺-dependent trans interaction with phospholipids. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 904-911.
- Steinschneider A. (1972). Prolonged apnea and the sudden infant death syndrome: clinical and laboratory observations. *Pediatrics* **50**, 646-654.
- Stettler H, Beuret N, Prescianotto-Baschong C, Fayard B, Taupenot L & Spiess M. (2009). Determinants for chromogranin A sorting into the regulated secretory pathway are also sufficient to generate granule-like structures in non-endocrine cells. *Biochem J* **418**, 81-91.
- Stotz SC & Zamponi GW. (2001). Identification of inactivation determinants in the domain IIS6 region of high voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* **276**, 33001-33010.
- Straley SC, Plano GV, Skrzypek E, Haddix PL & Fields KA. (1993). Regulation by Ca²⁺ in the Yersinia low-Ca²⁺ response. *Mol Microbiol* **8**, 1005-1010.

- Sugita S. (2008). Mechanisms of exocytosis. *Acta Physiol (Oxf)* **192**, 185-193.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R & Brunger AT. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347-353.
- Takahashi K, Wakamori M & Akaike N. (1989). Hippocampal CA1 pyramidal cells of rats have four voltage-dependent calcium conductances. *Neurosci Lett* **104**, 229-234.
- Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF & Catterall WA. (1987). Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5478-5482.
- Takeuchi Y, Mochizuki-Oda N, Yamada H, Kurokawa K & Watanabe Y. (2001). Nonneurogenic hypoxia sensitivity in rat adrenal slices. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 51-56.
- Tamargo J. (2003). *La patología de los canales iónicos (canalopatías)*. Instituto de España (IdeE) Madrid.
- Tanabe T, Mikami A, Niidome T, Numa S, Adams BA & Beam KG. (1993). Structure and function of voltage-dependent calcium channels from muscle. *Ann N Y Acad Sci* **707**, 81-86.
- Tang CM, Presser F & Morad M. (1988). Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science* **240**, 213-215.
- Tanner VA, Ploug T & Tao-Cheng JH. (1996). Subcellular localization of SV2 and other secretory vesicle components in PC12 cells by an efficient method of preembedding EM immunocytochemistry for cell cultures. *J Histochem Cytochem* **44**, 1481-1488.
- Taraska JW & Almers W. (2004). Bilayers merge even when exocytosis is transient. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8780-8785.
- Thompson RJ, Buttigieg J, Zhang M & Nurse CA. (2007). A rotenone-sensitive site and H₂O₂ are key components of hypoxia-sensing in neonatal rat adrenomedullary chromaffin cells. *Neuroscience* **145**, 130-141.

- Thompson RJ, Farragher SM, Cutz E & Nurse CA. (2002). Developmental regulation of O(2) sensing in neonatal adrenal chromaffin cells from wild-type and NADPH-oxidase-deficient mice. *Pflugers Arch* **444**, 539-548.
- Thompson RJ, Jackson A & Nurse CA. (1997). Developmental loss of hypoxic chemosensitivity in rat adrenomedullary chromaffin cells. *J Physiol* **498** (Pt 2), 503-510.
- Thompson RJ & Nurse CA. (1998). Anoxia differentially modulates multiple K⁺ currents and depolarizes neonatal rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol* **512** (Pt 2), 421-434.
- Tillotson D. (1979). Inactivation of Ca conductance dependent on entry of Ca ions in molluscan neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1497-1500.
- Tisa LS & Adler J. (1992). Calcium ions are involved in Escherichia coli chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11804-11808.
- Tisa LS & Adler J. (1995). Chemotactic properties of Escherichia coli mutants having abnormal Ca²⁺ content. *J Bacteriol* **177**, 7112-7118.
- Tischler AS. (2002). Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons. *Ann N Y Acad Sci* **971**, 366-370.
- Tonkin S. (1975). Sudden infant death syndrome: hypothesis of causation. *Pediatrics* **55**, 650-661.
- Torrecilla I, Leganes F, Bonilla I & Fernandez-Pinas F. (2000). Use of recombinant aequorin to study calcium homeostasis and monitor calcium transients in response to heat and cold shock in cyanobacteria. *Plant Physiol* **123**, 161-176.
- Torrecilla I, Leganes F, Bonilla I & Fernandez-Pinas F. (2004). A calcium signal is involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium Anabaena sp. PCC7120. *Microbiology* **150**, 3731-3739.
- Trifaro JM & Lee RW. (1980). Morphological characteristics and stimulus-secretion coupling in bovine adrenal chromaffin cell cultures. *Neuroscience* **5**, 1533-1546.
- Tsien RW, Ellinor PT & Horne WA. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 349-354.

- Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR & Fox AP. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* **11**, 431-438.
- Tsuboi T, McMahon HT & Rutter GA. (2004). Mechanisms of dense core vesicle recapture following "kiss and run" ("cavicapture") exocytosis in insulin-secreting cells. *J Biol Chem* **279**, 47115-47124.
- Tytgat J, Vereecke J & Carmeliet E. (1988). Differential effects of verapamil and flunarizine on cardiac L-type and T-type Ca channels. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **337**, 690-692.
- Unsicker K, Tschechne B & Tschechne D. (1978). Formation of cholinergic synapses on adrenal chromaffin cells in anterior eye chamber transplants. *Brain Res* **152**, 334-340.
- Urena J, Fernandez-Chacon R, Benot AR, Alvarez de Toledo GA & Lopez-Barneo J. (1994). Hypoxia induces voltage-dependent Ca²⁺ entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10208-10211.
- Van Lamsweerde-Gallez D & Meessen A. (1978). Kinetic properties of electrostatic pores with orientable dipoles, for Na⁺ and K⁺ transport through biological membranes. *J Membr Biol* **40**, 39-66.
- van Weering JR, Toonen RF & Verhage M. (2007). The role of Rab3a in secretory vesicle docking requires association/dissociation of guanidine phosphates and Munc18-1. *PLoS One* **2**, e616.
- Verna A, Roumy M & Leitner LM. (1975). Loss of chemoreceptive properties of the rabbit carotid body after destruction of the glomus cells. *Brain Res* **100**, 13-23.
- Villalobos C, Nunez L, Montero M, Garcia AG, Alonso MT, Chamero P, Alvarez J & Garcia-Sancho J. (2002). Redistribution of Ca²⁺ among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J* **16**, 343-353.
- Villarroya M, Olivares R, Ruiz A, Cano-Abad MF, de Pascual R, Lomax RB, Lopez MG, Mayorgas I, Gandia L & Garcia AG. (1999). Voltage inactivation of Ca²⁺ entry and secretion associated with N- and P/Q-type but not L-type Ca²⁺ channels of bovine chromaffin cells. *J Physiol* **516** (Pt 2), 421-432.

- Vitale ML, Seward EP & Trifaro JM. (1995). Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron* **14**, 353-363.
- Viveros OH, Diliberto EJ, Jr., Hazum E & Chang KJ. (1979). Opiate-like materials in the adrenal medulla: evidence for storage and secretion with catecholamines. *Mol Pharmacol* **16**, 1101-1108.
- Voets T. (2000). Dissection of three Ca^{2+} -dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* **28**, 537-545.
- Voets T, Moser T, Lund PE, Chow RH, Geppert M, Sudhof TC & Neher E. (2001a). Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11680-11685.
- Voets T, Neher E & Moser T. (1999). Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* **23**, 607-615.
- Voets T, Toonen RF, Brian EC, de Wit H, Moser T, Rettig J, Sudhof TC, Neher E & Verhage M. (2001b). Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* **31**, 581-591.
- Vogt M. (1954). Norepinephrine and epinephrine in the central nervous system. *Pharmacol Rev* **6**, 31-32.
- Wada A, Wanke E, Gullo F & Schiavon E. (2008). Voltage-dependent $\text{Na(v)}1.7$ sodium channels: multiple roles in adrenal chromaffin cells and peripheral nervous system. *Acta Physiol (Oxf)* **192**, 221-231.
- Walker DW. (1984). Peripheral and central chemoreceptors in the fetus and newborn. *Annu Rev Physiol* **46**, 687-703.
- Walters DV & Olver RE. (1978). The role of catecholamines in lung liquid absorption at birth. *Pediatr Res* **12**, 239-242.
- Wallace DJ, Chen C & Marley PD. (2002). Histamine promotes excitability in bovine adrenal chromaffin cells by inhibiting an M-current. *J Physiol* **540**, 921-939.
- Wallner M, Meera P & Toro L. (1996). Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca^{2+} -sensitive K^+ channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14922-14927.

- Wang ZW, Kunkel MT, Wei A, Butler A & Salkoff L. (1999). Genomic organization of nematode 4TM K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* **868**, 286-303.
- Wasicko MJ, Sterni LM, Bamford OS, Montrose MH & Carroll JL. (1999). Resetting and postnatal maturation of oxygen chemosensitivity in rat carotid chemoreceptor cells. *J Physiol* **514** (Pt 2), 493-503.
- Watanabe H, Yamashita T, Saitoh N, Kiyonaka S, Iwamatsu A, Campbell KP, Mori Y & Takahashi T. (2010). Involvement of Ca²⁺ channel synprint site in synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci* **30**, 655-660.
- Watkins NJ, Knight MR, Trewavas AJ & Campbell AK. (1995). Free calcium transients in chemotactic and non-chemotactic strains of *Escherichia coli* determined by using recombinant aequorin. *Biochem J* **306** (Pt 3), 865-869.
- Werthen M & Lundgren T. (2001). Intracellular Ca(2+) mobilization and kinase activity during acylated homoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia liquefaciens*. *J Biol Chem* **276**, 6468-6472.
- West GB, Shepherd DM, Hunter RB & Macgregor AR. (1953). The function of the organs of *Zuckerkandl*. *Clin Sci (Lond)* **12**, 317-325.
- Weston JA. (1970). The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv Morphog* **8**, 41-114.
- Wible BA, De Biasi M, Majumder K, Taglialatela M & Brown AM. (1995). Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K⁺ channel from human atrium. *Circ Res* **76**, 343-350.
- Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ, Jr. & Viveros OH. (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10754-10758.
- Williams SE, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, Peers C & Kemp PJ. (2004). Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* **306**, 2093-2097.
- Winkler H & Westhead E. (1980). The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* **5**, 1803-1823.

- Wyatt CN, Wright C, Bee D & Peers C. (1995). O₂-sensitive K⁺ currents in carotid body chemoreceptor cells from normoxic and chronically hypoxic rats and their roles in hypoxic chemotransduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 295-299.
- Xu T, Naraghi M, Kang H & Neher E. (1997). Kinetic studies of Ca²⁺ binding and Ca²⁺ clearance in the cytosol of adrenal chromaffin cells. *Biophys J* **73**, 532-545.
- Yaari Y, Hamon B & Lux HD. (1987). Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science* **235**, 680-682.
- Yang DM & Kao LS. (2001). Relative contribution of the Na(+)/Ca(2+) exchanger, mitochondria and endoplasmic reticulum in the regulation of cytosolic Ca(2+) and catecholamine secretion of bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* **76**, 210-216.
- Yang SN & Berggren PO. (2006). The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* **27**, 621-676.
- Ye JH & Akaike N. (1993). Calcium currents in pyramidal neurons acutely dissociated from the rat frontal cortex: a study by the nystatin perforated patch technique. *Brain Res* **606**, 111-117.
- Yool AJ & Schwarz TL. (1991). Alteration of ionic selectivity of a K⁺ channel by mutation of the H5 region. *Nature* **349**, 700-704.
- Yu XC & Margolin W. (1997). Ca²⁺-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro. *EMBO J* **16**, 5455-5463.
- Yuan SZ, Runold M & Lagercrantz H. (1997). Adrenalectomy reduces the ability of newborn rats to gasp and survive anoxia. *Acta Physiol Scand* **159**, 285-292.
- Zamponi GW. (2003). Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins. *J Pharmacol Sci* **92**, 79-83.
- Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW & Tsien RW. (1994). Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* **372**, 97-100.
- Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL & Tsien RW. (1993). Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal

Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* **32**, 1075-1088.

Zhang L, Zhou L, Vega-Gonzalez A, Mendoza D & Drucker-Colin R. (1997). Extremely low frequency magnetic fields promote neurite varicosity formation and cell excitability in cultured rat chromaffin cells. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **118**, 295-299.

Zhong H, Yokoyama CT, Scheuer T & Catterall WA. (1999). Reciprocal regulation of P/Q-type Ca²⁺ channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin. *Nat Neurosci* **2**, 939-941.

Zhou Z & Misler S. (1995). Action potential-induced quantal secretion of catecholamines from rat adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* **270**, 3498-3505.

Zhou Z & Neher E. (1993). Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol* **469**, 245-273.

Zhu WH, Conforti L, Czyzyk-Krzeska MF & Millhorn DE. (1996). Membrane depolarization in PC-12 cells during hypoxia is regulated by an O₂-sensitive K⁺ current. *Am J Physiol* **271**, C658-665.

Zhu Y, Zboran EL & Ikeda SR. (1995). Phenotype-specific expression of T-type calcium channels in neurons of the major pelvic ganglion of the adult male rat. *J Physiol* **489** (Pt 2), 363-375.

10.- APÉNDICE DE LOS ARTÍCULOS

ARTÍCULO 1

Differences in the quantal release of catecholamines in chromaffin cells of rat embryos and their mothers

José C. Fernández-Morales,^{1,2} Lorena Cortés-Gil,^{1,2} Antonio G. García,^{1,2,3} and Antonio M. G. de Diego^{1,2}

¹Instituto Teófilo Hernando, ²Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, and ³Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de la Princesa and Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Submitted 25 February 2009; accepted in final form 10 May 2009

Fernández-Morales JC, Cortés-Gil L, García AG, de Diego AM. Differences in the quantal release of catecholamines in chromaffin cells of rat embryos and their mothers. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: C407–C418, 2009. First published May 13, 2009; doi:10.1152/ajpcell.00086.2009.—Studies on the bulk catecholamine release from fetal and neonatal rat adrenals, adrenal slices, or isolated chromaffin cells stimulated with high K^+ , hypoxia, hypercapnia, or acidosis are available. However, a study analyzing the kinetics of quantal secretion is lacking. We report here such a study in which we compare the quantal release of catecholamines from immature rat embryo chromaffin cells (ECCs) and their mothers' (MCCs). Cell challenging with a strong depolarizing stimulus (75 mM K^+) caused spike bursts having the following characteristics. ECCs released more multispike events and wave envelopes than MCCs. This, together with narrower single-spike events, a faster decay, and a threefold smaller quantal size suggest a faster secretory machinery in ECCs. Furthermore, with a milder stimulus (25 mM K^+) enhanced Ca^{2+} entry by L-type Ca^{2+} channel activator BAY K 8644 did not change the kinetic parameters of single spikes in ECCs; in contrast, augmentation of Ca^{2+} entry increased spike amplitude and width, quantal size, and decay time in MCCs. This suggests that in mature MCCs, the last exocytotic steps are more tightly regulated than in immature ECCs. Finally, we found that quantal secretion was fully controlled by L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCCs) in ECCs, whereas both L- and non-L VDCCs (N and PQ) contributed equally to secretion control in MCCs. Our results have the following physiological, pharmacological, and clinical relevance: 1) they may help to better understand the regulation of adrenal catecholamine release in response to stress during fetal life and delivery; 2) if clinically used, L-type Ca^{2+} channel blockers may augment the incidence of sudden infant death syndrome (SIDS); and 3) so-called Ca^{2+} promoters or activators of Ca^{2+} entry through L-type VDCCs may be useful to secure a healthy catecholamine surge upon violent stress during fetal life, at birth, or to prevent the SIDS in neonates at risk.

rat chromaffin cell; quantal catecholamine secretion; exocytosis; amperometry; calcium channels

THE ADRENAL MEDULLA of the fetal and neonatal mammals plays a more relevant role in adaptation to stress than in the adult (47). In fact, in newborn humans there is a profound surge of adrenal catecholamine release at delivery (27, 28); this may assist the neonate in adapting respiratory, cardiovascular, and metabolic function to demands of extrauterine life (24). Thus it is not surprising that interfering with the catecholamine surge is associated with decreased survival potential (27, 28, 41).

In many species, including humans, sympathetic innervation of autonomic end organs is absent or nonfunctional at birth (7, 8, 20, 36, 42–44). In fact, the neonate is predominantly dependent on adrenal medullary catecholamine release for achieving adrenergic responses to stress. In the rat, splanchnic control of adrenal catecholamine release is absent during fetal life and at birth. Some studies show that excised neonatal rat adrenals stimulated with depolarizing concentrations of K^+ evoke a Ca^{2+} -dependent pronounced release of catecholamines, indicating that neonatal chromaffin cells contain all the machinery necessary for the exocytotic release of chromaffin granule contents (39, 43, 45, 46). Such K^+ -evoked response requires Ca^{2+} entry through voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCCs), as first reported by Douglas and Rubin (12).

Several laboratories have studied the release of catecholamines from fetal and neonatal rat adrenals, adrenal slices, or isolated chromaffin cells stimulated with high K^+ , hypoxia, hypercapnia, or acidosis (4, 5, 32, 38, 51, 52). Bounard et al. (5) found that 50% of rat embryo chromaffin cells (ECCs) expressed T-type low-threshold VDCCs, whereas the other 50% had both T channels and high-threshold VDCCs; only these last channels were involved in secretion. Neither in this study nor in the studies mentioned above, quantal secretion or the subtypes of high-threshold VDCCs controlling such response were approached. Those studies only measured bulk catecholamine release and did not approach the study of the kinetics of single-vesicle secretory events.

We approached here such a study using a carbon fiber microelectrode and the amperometric technique to measure the single-vesicle secretory events from a single isolated ECC (E18) and mother's chromaffin cells (MCC) stimulated with brief K^+ pulses. We found drastic kinetic differences in quantal size, quantal content, foot frequency, spike shape, and event secretory patterns that suggest different modes of catecholamine release during fetal life and adulthood. Furthermore, we found that blockers of the distinct high-threshold VDCC subtypes differently inhibited quantal secretion from ECCs and MCCs. To our knowledge, this is the first study reporting such drastic differences between quantal secretion in ECCs and MCCs. These data may contribute to better understand the physiological role of quantal catecholamine release upon stressful situations of fetal and early postnatal life before chromaffin cell secretion is neurologically controlled by the splanchnic nerve.

METHODS

Cell culture. All experimental procedures with animals were performed following the rules of and approved by the Universidad Autónoma medical school's ethical committee for the care and use of

Address for reprint requests and other correspondence: A. M. G. de Diego, Instituto Teófilo Hernando, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo, 4. 28029 Madrid, Spain (E-mail: antoniomiguel.garcia@uam.es).

animals in research, in accordance with the European Community Council Directive of November 24 1986 (86/609/EEC) and with the Spanish Real Decreto of October 10 2005 (RD 1201/2005). All efforts were made to minimize animal suffering. Rats were housed individually under controlled temperature and lighting conditions with food and water provided ad libitum.

Chromaffin cells were obtained from 18-day-old (E18) rat embryos by a protocol previously described for mice (49) with some modifications: the pregnant Wistar rat was killed by decapitation, and the fetuses were rapidly extracted and immediately decapitated. Adrenal glands were then removed from the embryos, fat-trimmed, and introduced in 1 ml of an enzymatic solution of identical composition to the one described by Sorensen et al. (37). Papain (15–20 U/ml) was added for tissue digestion. Adrenals were digested for 10 min; 750 μ l of another solution aimed at stopping the enzymatic reaction were then added for 5 min. This solution was exchanged by 1 ml DMEM, and glands were minced with a 1-ml micropipette, filtered through an 80- μ m nylon mesh, and centrifuged for 10 min at 800 rpm. The supernatant was removed, and 600 to 1,200 μ l of DMEM were added. A 50- to 100- μ l drop of cell-containing solution was plated on poly-D-lysine-coated coverslips of one or two 12-well plates. After 1 h in an incubator, 1–2 ml DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum, 50 IU/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin were added to each well. The glands of the mother rat were also removed. Chromaffin cells were obtained by applying a similar protocol to that described above with slight differences; i.e., previous to digestion the medulla was dissected out, 40 U/ml papain were added to the enzymatic solution, and digestion time was 50–60 min. Experiments were carried out in cells that were kept in a water-saturated incubator at 37°C and a 5% CO₂ atmosphere for 1 to 7 days.

Amperometric recordings. Catecholamines released from single cells were measured by amperometry (9, 56). Electrodes were built as previously described (25) by introducing a 10- μ m diameter graphite fiber (Amoco) into glass capillary tubes (Kimble-Kontes). These tubes were then pulled (Narisighe PC-10 pipette puller), and the carbon fiber was inserted in both thin ends of the pulled tube and was cut with a pair of small scissors obtaining thus two pipettes with a carbon fiber piece sticking out of each tip. The tip was sealed by a two-component epoxy (EPIKOTE 828-Miller-Stephenson, Danbury, CT; and *m*-phenyldiamine, 14%, Aldrich, Steinheim, Germany). The electrodes were left overnight to dry, introduced into an oven at 100°C for 2 h, and then kept another 2 h at 150°C. The amperometer was homemade (UAM workshop) and connected to an interface (PowerLab/4SP ADInstruments) that digitized the signal at 10 kHz sending it to an Apple McIntosh Power PC computer that displayed it within the Chart V. 4.2 software (ADInstruments). A 730-mV potential was applied to the electrode with respect to an AgCl ground electrode. The electrodes were calibrated following good amperometric practices (29) by perfusing 50 μ M norepinephrine dissolved in standard Tyrode and measuring the current elicited; only electrodes that yielded a current between 200 and 400 pA were used. The coverslips were mounted in a chamber on a Nikon Diaphot inverted microscope used to localize the target cell, which was continuously superfused by means of a five-way superfusion system with a common outlet driven by electrically controlled valves, with a Tyrode solution composed of (in mmol/l) 137 NaCl, 1 MgCl₂, 5.3 KCl, 2 CaCl₂, 10 HEPES, and 10 glucose (pH 7.3, NaOH). The high K⁺ solutions were prepared by replacing equiosmolar concentrations of NaCl with KCl. At the time of experiment performance, proper amounts of drug stock solutions were freshly dissolved into the Tyrode solution.

Chemical products. Products to make saline solutions, BAY K 8644, and nimodipine were purchased to Sigma (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). ω -Conotoxin MVIIC was from Peptide Institute (Osaka, Japan). DMEM was from GIBCO (Scotland, UK), fetal bovine serum was from PAA laboratories (Pasching, Austria), and papain was from Worthington (Lakewood, NJ).

Data analysis and statistics. Total amperometric charge was calculated by integrating the amperometric current signal over time during the 10-s stimulus duration by means of a macro written in Igor Pro software (Wavemetrics). Number of spikes was manually counted on an extended graph displayed in the computer screen. We chose 10 pA as a reasonable cut-off for spike amplitude; a ruler was drawn at 10 pA and spikes greater than 10 pA amplitude were considered. Single spike analysis was carried out by means of an Igor macro kindly made publicly available by the Sulzer lab from the Department of Neurology and Psychiatry, Columbia University, New York, NY (written by E. Mosharov, <http://www.sulzerlab.org/download.html>). Recordings were filtered offline at 1 kHz. The macro identified well-isolated spikes of 5 pA; this value was chosen as a minimum amplitude to take into account as much spikes as possible and perform a more complete single spike analysis. All events were visually checked one by one. For spike selection the following criteria was applied: the macro calculates a baseline for every spike that starts a few milliseconds before the spike; I_{\max} and Q are calculated from this baseline. We chose baselines that were parallel to the abscissa axis; if no such baseline could be calculated the spike was discarded. Overlapping spikes were also discarded.

ECCs showed a wave envelope more frequently (a rise with a slow return to baseline on top of which isolated and overlapping events could be observed; see first and second sections in RESULTS and Fig. 1) than that seen in MCCs. It could happen that events in cells that showed this wave envelope were kinetically different. In the case of the wave envelope we are implicitly assuming that in the resolvable spikes the rising phase starts on top of the envelope, in which case the rising phase parameters should not be affected. Perhaps the last part of the decay of the spike could be somewhat affected, which would result in deflated Q values. To test whether this way of analyzing was introducing a bias, we analyzed separately the event parameters of the ECCs that showed wave envelopes and compared them with those that did not show them. There was no statistical difference in any of the parameters, and the values were similar to those found pooling all cells together (see Table 1). This result shows that no underestimation or overestimation is made with the analysis performed and allows the pooling of all the cells together for single spike analysis. ECCs showed also more overlapping spikes (see second section in RESULTS and Fig. 2). If overlapping events were different from isolated events, our samples could not be representative of the entire population of quantal events emitted by the chromaffin cells and a bias could have been introduced; for this reason we decided to analyze at least 20 spikes per cell to reduce as much as possible any bias. We did not notice visually any special peculiarities in overlapping spikes compared with isolated. Additionally, an article published recently (3) suggests that there is no difference in the spike kinetics between recordings with a lot of overlapping events and recordings with few multispike events, providing that a sufficient number of isolated spikes are analyzed per cell. They compare amperometric recordings obtained from chromaffin cells with microelectrodes of different diameters. Obviously larger diameter electrodes have higher probability of multiple spike appearance (up to 51% according to Amatore et al. in Ref. 3), whereas thinner microelectrodes have lower probability of overlapping spikes (17%). If leaving out of the analysis the overlapping spikes introduced a bias in the kinetic properties of the spikes and since the percentage of overlapping spikes with thicker electrodes is three times that of the thinner electrodes, a difference in some kinetic parameters should appear when the cells are challenged with the same stimulus (there is no reason to think that the diameter of the electrode affects the way in which exocytosis occurs). However, Amatore et al. (3) report statistically similar Q_{amp} , I_{amp} , half-width, and t_{20-90} values obtained with several different diameter electrodes; also the percentage of prespike feet remains constant.

The macro calculated automatically the kinetic parameters; then the mean of all spikes for every parameter was calculated cell by cell. Tests for statistical differences between groups were performed using

these means; i.e., one value per cell and per parameter; this is a more reliable method for statistical comparisons performed on amperometric single spike data (6, 31). Data are presented in box-and-whiskers plots: the line inside the box depicts median values, the size of the box is given by the distance between the 25th and the 75th percentiles; upper "whisker" reach the 90th percentile and lower "whisker" the percentile 10. Box plots are a more informative way of presenting data, since they give a more precise idea of the scatter of the sample with the 10th, 25th, 75th, and 95th percentiles and the median. Means \pm SE are also indicated throughout the text, in the figure legends, and in tables. Data sets were tested for normality (Kolmogorov-Smirnov normality test), an assumption for the application of the Student's *t*-test or ANOVA. We found that most groups didn't fit well to normal distributions, thus two nonparametric statistical tests were used: Mann-Whitney's rank sum test to compare two samples or Kruskal-Wallis' repeated measures one-way ANOVA on ranks for more than two groups; in the case of the finding of statistically significant differences, Dunn's multiple comparisons versus control group post hoc test was applied to determine which groups were statistically different. In some instances where parametric test assumptions were fulfilled, we also performed parametric tests (Student's *t*-test or one-way ANOVA with Bonferroni versus control group post hoc test when appropriate) and compared the results with those of the nonparametric tests. Both tests produced similar results. All statistical analysis was performed using SPSS 13 (SPSS, Chicago, IL) and MS Excel (Microsoft, Redmond, WA). A *P* value equal or smaller than 0.05 was taken as the limit of significance.

RESULTS

Secretion evoked by cell perfusion of depolarizing 75 K⁺ solution. Chromaffin cells secrete catecholamines by exocytosis. The main mechanism that rises cytosolic [Ca²⁺]_i ([Ca²⁺]_c), which couples the stimulus to the secretory response, is the opening of VDCCs (11). Since the chromaffin cell membrane is permeable to K⁺, raising the extracellular [K⁺] automatically entails the depolarization of the cell membrane following approximately the Nernst equation (23). Thus the high-K⁺ solution used here (75 mM) will reduce the membrane potential to near 0 mV (10, 35); this will cause the rapid activation of VDCCs, Ca²⁺ entry, and the release of a burst of spikes as a result of the release of catecholamine quanta, which will be detected by the carbon fiber electrode (56).

When stimulated with a 10-s 75 K⁺ pulse, both ECCs and MCCs responded with a burst of secretory spikes. Sometimes the secretory activity extended 3–4 s after the K⁺ pulse but in others the secretory activity ceased 2–3 s before the end of the K⁺ pulse. When the integrated area of the entire spike burst was plotted (cumulative charge in pC), the secretion response from MCCs had a 35% greater total cumulative charge (quantal content) compared with ECCs (Fig. 1C, right). It was noteworthy that the number of spikes in the burst was similar in ECCs and MCCs (Fig. 1C, left); this suggests that the area of single amperometric events (quantal size) should be greater in MCCs, as discussed in the next section.

Differences in spike shapes between the K⁺ secretory responses of ECCs and MCCs. Soon after the first description of the use of a carbon fiber electrode to measure single-vesicle secretory events with amperometry (56), the discovery that some spikes were preceded by a "foot" was reported. This foot was interpreted to be due to a slow catecholamine release through a narrow fusion pore, which precedes the full-pore expansion and the rapid release of the catecholamines present in a vesicle, which gives rise to the fast amperometric spike (9).

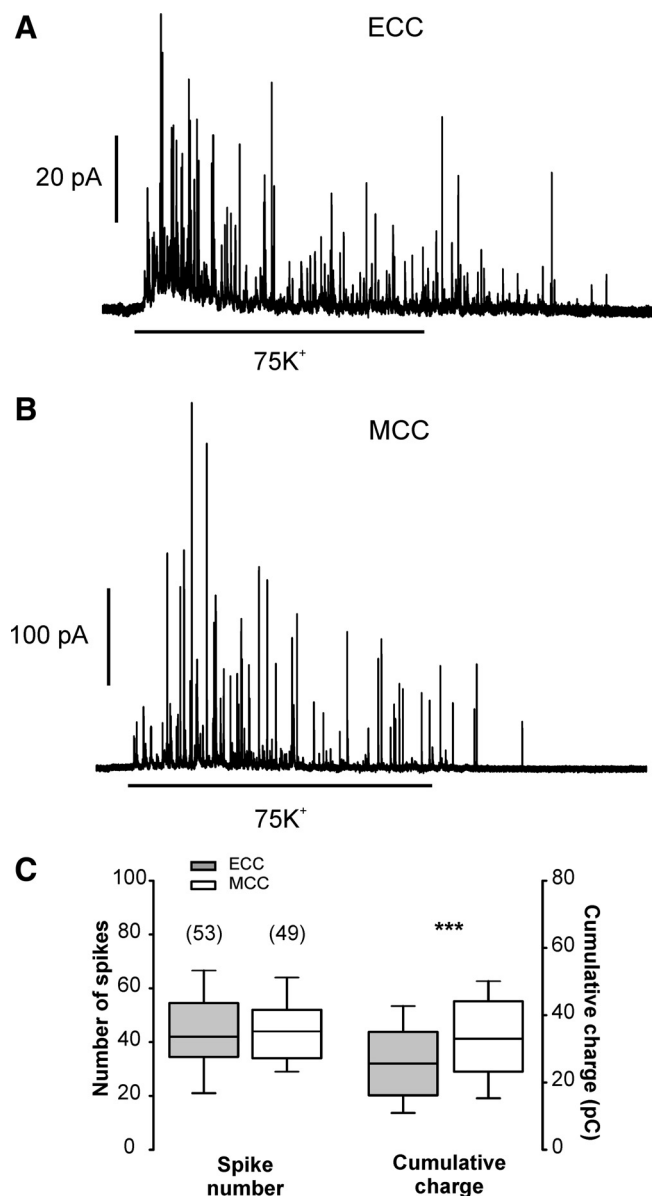


Fig. 1. Quantal secretory responses elicited by 75-K⁺ pulses. Original recordings of the response to a 10-s 75-K⁺ pulse applied to an embryo chromaffin cell (ECC) (A) and a mother's chromaffin cell (MCC) (B); notice the difference in current scale. Pooled results of number of spikes (left axes) and cumulative charge (*Q*_{amp}, right axes) of the number of cells shown in parentheses (C). Three such consecutive 75-K⁺ pulses were given every 5 min with similar results to the first pulse in both parameters to both ECCs and MCCs. ****P* < 0.001 Mann-Whitney rank-sum test.

The frequency of spikes with foot and stand-alone spikes greatly varies in chromaffin cells from different species and experimental conditions (2, 48, 55), reflecting different modes of secretion. Thus it was interesting to see whether the K⁺-elicited spike events were preceded by a foot and the percentage of such events in ECCs and MCCs.

In this and the following sections, we analyze the events generated by the 10-s 75 K⁺ pulse only in those cells that produced 20 or more resolvable single spikes larger than 5 pA. Figure 2A shows two superimposed spikes preceded by a foot, taken from records in an ECC and a MCC. Note the smaller sizes of foot and spike in the ECC event when compared with

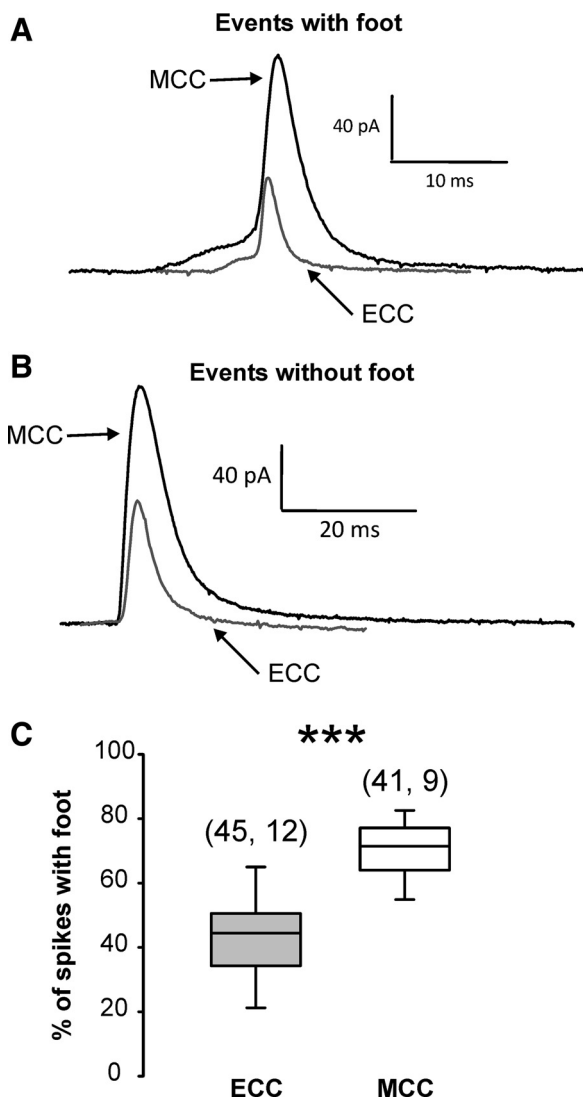


Fig. 2. Secretory spike events preceded with a foot were more frequent in the 75-K⁺-evoked secretory burst responses in MCCs when compared with ECCs. Events were manually examined to determine the frequency of spikes with foot (A) or without foot (B) from MCCs and ECCs. C: percentage of spikes with foot (ordinate) from ECCs and MCCs. This proportion was calculated by counting individual spikes starting at baseline current, in the number of cells and cultures shown in parentheses. ****P* < 0.001, Mann-Whitney rank-sum test. Only cells responding with a secretory burst having 20 or more resolvable isolated events were considered.

the MCC event. Figure 2B shows superimposed examples of isolated events with no foot. Again, the ECC spike was substantially smaller than the MCC spike. The frequency of spikes with foot was significantly higher in MCCs (70%) than in ECCs (45%) (Fig. 2C).

We also analyzed the proportion of well-defined and separated single spikes and trace segments having multiple spikes that did not reach baseline individually. Multiple spikes are likely an indication of faster release of catecholamines from docked vesicles that are already primed to undergo exocytosis (33), upon Ca²⁺ entry through VDCCs that were fully activated by the 75-K⁺ pulse, an stimulus known to cause a strong depolarization in current-clamped chromaffin cells (35).

In counting the number of multiple and single spikes in the secretion traces obtained from ECCs and MCCs stimulated

with a 75-K⁺ pulse, we found pronounced differences. An example segment of an ECC trace is shown in Fig. 3A; note the multiple spikes along the trace. This sharply contrasts with the example segment trace of Fig. 3B that belongs to a MCC; two multiple events having two spikes each are indicated by arrows. Figure 3C shows the proportion of multiple spikes seen in ECCs and MCCs; whereas the ECC secretory traces contained as much as 42% of multiple spikes, the MCCs only had around 9% of such spikes.

We also counted the number of cells that showed an initial pronounced wave envelope and found that 43% ECCs showed this behavior against only 12% MCCs. We counted the number of smaller wave envelopes along the stimulation period as well; 100% ECCs and 70% MCCs presented such responses.

Frequency histogram analysis of the number of spikes and the quantal size of single events in ECCs and MCCs. We used 10-s 75-K⁺ pulses to elicit a burst of secretory events. Under this prolonged cell depolarization, VDCCs will undergo inactivation and the secretory activity will tend to decay (54). This seemed to be the case when analyzing the number of spikes

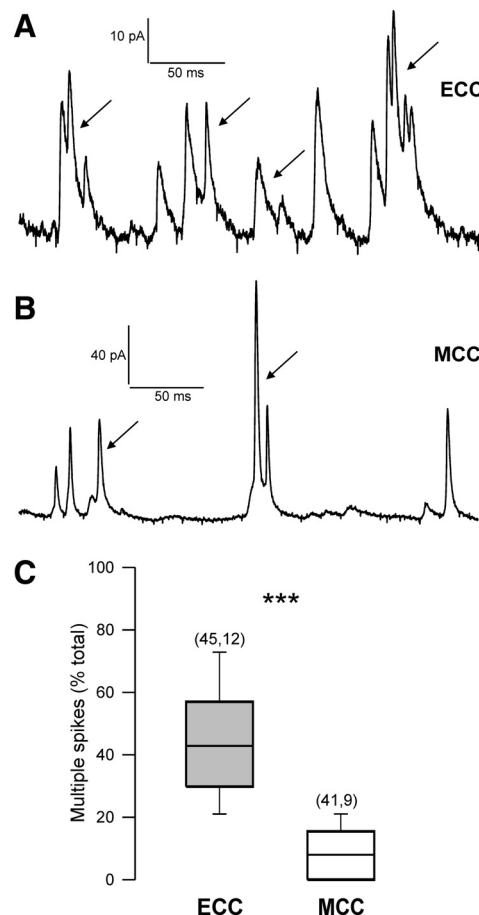


Fig. 3. The frequency of secretory events containing multiple spikes present in the 75-K⁺-evoked burst responses was substantially higher in ECCs when compared with MCCs. Events were manually examined to determine those having a single spike that reached baseline or multiple spikes that did not reach baseline. A: example trace obtained from an ECC; B: example trace obtained from a MCC. C: percentage of multiple spikes present in traces from ECCs and MCCs (ordinate). The number of single and multiple events was normalized to 100% in each individual cell. Data are from the number of cells and cultures shown in parentheses. ****P* < 0.001, Mann-Whitney rank-sum test.

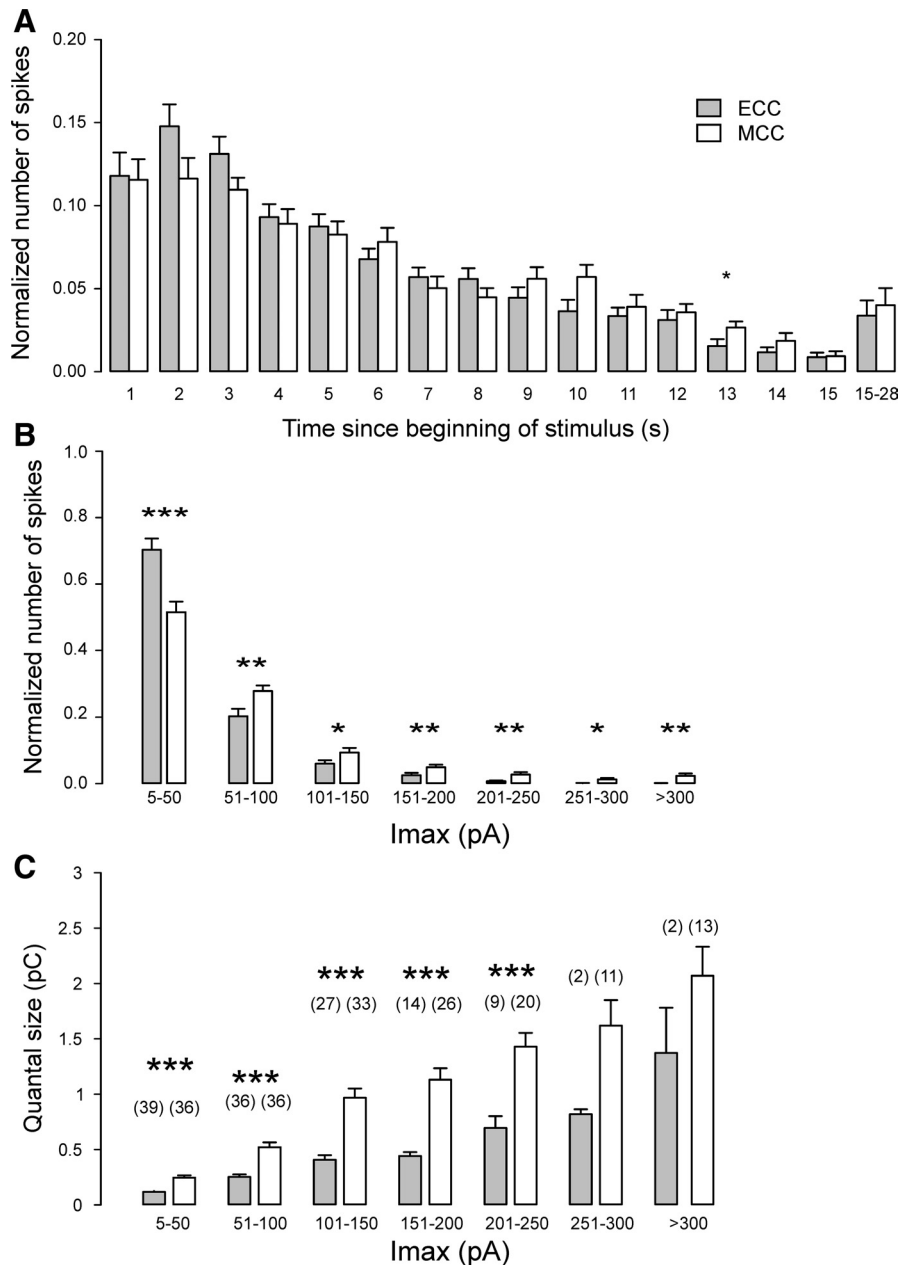


Fig. 4. Frequency histograms and quantal size of individual secretory events of ECCs and MCCs stimulated with K^+ . A: normalized number of spikes (ordinate) as a function of time (abscissa). B: normalized number of spikes (ordinate) as a function of spike amplitude (abscissa). C: quantal size of individual spikes (ordinate) as a function of spike amplitude. Data are means \pm SE of the number of cells shown in parentheses. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Mann-Whitney rank-sum test.

found in each secretory burst as a function of stimulation time (Fig. 4A). It was interesting that the number of spikes present in each 1-s trace segment was similar in ECCs and MCCs, except at the second 13 where MCCs had more spikes. These data agree with those obtained counting total number of spikes when the whole secretory response trace was measured (Fig. 1C, left).

We also felt of interest to determine the number of spikes as a function of spike amplitude. Here, we found clear differences. For instance, at 5–50 pA amplitude, ECCs produced around 30% more spikes. However, at higher event amplitudes, MCCs had more spikes. This is consistent with the fact that MCCs had spikes of greater amplitude when compared with ECCs (see Fig. 2, A and B).

Drastic differences in quantal content of individual secretory events were also found, as shown in the histogram of Fig. 4C.

Irrespective of spike amplitude, the mean quantal size was about two- to threefold higher in MCCs when compared with ECCs.

Since the quantal size of single spikes was threefold higher in MCCs (Table 1), an obvious prediction was that the 45 spikes secreted by a K^+ -depolarizing stimulation in MCCs should give a total integrated charge threefold higher than that resulting from the integration of the 45 spikes from ECCs. It was surprising though that MCC total cumulative charge was only 35% above the ECC response (Fig. 1D, right two columns). We thought that this “hidden” secretion that appears in the total cumulative charge could be due to differences in the way bulk secretion occurs. Whereas MCC spikes tended to be detected as single events or in scattered groups of a few overlapping spikes, a larger amount of ECCs showed a wave envelope shape at the beginning of the response possibly due to

a massive fast initial secretion (see Fig. 1A). To quantify differences in this behavior between ECCs and MCCs, we counted the number of cells that showed an initial pronounced wave envelope. Thus, as pointed out in the previous section, 43% of ECCs showed this behavior against only 12% of MCCs. We also counted groups of smaller wave envelopes along the stimulation period; 100% ECCs and 70% MCCs presented such responses. Finally, ECCs wave envelopes tended to last longer than MCCs. This wave envelope carries a lot of charge and explains the greater than expected cumulative charge found in ECCs.

Kinetic analysis of spike and foot events obtained in ECCs and MCCs stimulated with a 75-K⁺ pulse. To analyze the kinetic parameters of single secretory events, we selected from each trace those departing and returning from baseline; thus, we discarded those events having two or more spikes (Fig. 2, A and B). Given that ECCs had 42% of overlapping events and MCCs only 12%, discarding multiple events could distort the comparison. We give some reasons why this is not the case in the METHODS. We analyzed a large number of cells and spikes (1,806 single spikes from 45 ECCs and 1,419 single spikes from 41 MCCs) to obtain a representative sample of the events emitted by both cell types.

Table 1 summarizes the differences in the kinetic parameters of ECC and MCC spikes. Rise rates were similar in both cell types; however, spike amplitude (I_{\max}) was 80% higher in MCCs. Considering that the quantal size is threefold higher in MCCs, the $t_{1/2}$ (an indication of spike width) and decay time must be greater in MCCs when compared with ECCs. This was the case since $t_{1/2}$ and decay times were almost double in MCCs (Table 1).

Table 2 summarizes the kinetic parameters of spike feet. We found no differences in foot amplitude between ECCs and MCCs. However, foot duration was 60% longer in MCCs; this could explain that the foot charge was larger in MCCs when compared with ECCs.

Effects of nimodipine and ω -conotoxin MVIIC (MVIIC) on quantal catecholamine release responses evoked by 75-K⁺ pulses given to ECCs and MCCs. Adult rat chromaffin cells express L (α_{1D} , $C_{av}1.3$), N (α_{1B} , $C_{av}2.2$), and PQ (α_{1A} , $C_{av}2.1$) VDCCs. The relative contribution of each channel type to Ca²⁺ current (16) and secretion (26) in these cells has been studied by using selective blockers. Here, we have used nimodipine (3 μ M) and MVIIC (1 μ M); at this concentration, nimodipine completely blocks L-channels of chromaffin cells and MVIIC blocks the non-L-channels (N/PQ) (see García et al., Ref. 18). We therefore used these blockers to define the contribution of L- and non-L channels to the quantal catecholamine release evoked by 75-K⁺ pulses given to ECCs and MCCs.

We used a sandwich-type experiment consisting in the application of three sequential 10-s 75-K⁺ pulses to each cell, separated by a 5-min resting period (P1, P2, and P3). With this protocol, the integrated secretion of catecholamines and the number of spikes in the burst was similar along the three pulses (data not shown). In ECCs, nimodipine, given 30 s before and during P2, almost fully suppressed the secretory response, which readily recovered upon the drug washout (see the example top trace of ECC in Fig. 5A). In contrast, nimodipine only partially blocked the secretion of MCCs (bottom trace of Fig. 5A). Quantitative normalized data of 21 ECCs and 17 MCCs are plotted in Fig. 5, B and C, respectively. Nimodipine reduced by over 90% the spike number and the cumulative charge of the spike burst elicited by K⁺ in ECCs (P2); after washout, both parameters recovered to about 80% of the initial (P1) response. In contrast, in MCCs nimodipine reduced spike number by 60% and quantal content by 50%, also in a reversible manner.

Experiments with MVIIC are shown in Fig. 6. Figure 6A shows the K⁺-evoked spike burst triggered by three subsequent K⁺ pulses given to an ECC; the three traces were quite similar, despite the fact that MVIIC was present 1 min before and during the application of the K⁺ pulse P2 (top traces). In contrast, MVIIC reduced the P2 response in the example MCC trace shown at the bottom of Fig. 6A. Quantitative normalized data from 16 ECCs and 12 MCCs are shown in Fig 6, B and C. Whereas MVIIC did not modify the secretory response (measured as spike number and quantal content of bursts) in ECCs, the toxin reduced the spike number by 45% and cumulative charge by 60% in MCCs, an effect quantitatively similar to that of nimodipine (compare Fig. 5C with Fig. 6C). It was curious that this blocking effect of MVIIC was partially reversible; this may be due to two reasons: 1) the pretreatment period with the toxin before P2 application (1 min) was insufficient for irreversible binding of the toxin to N/PQ channels; and 2) the toxin binds irreversibly to PQ channels but reversibly to N channels (17). We addressed these issues by performing experiments with ω -conotoxin GVIA (a specific N-type Ca²⁺ channel blocker at a concentration of 1 μ M) and ω -agatoxin IVA (a specific P/Q type Ca²⁺ channel blocker at a concentration of 1 μ M). The perfusion of the combination of both toxins for 3 min previous to a 75-K⁺ stimulus produced no significant effect, neither in the integrated amperometric current nor in the number of spikes, with regard to the control pulse on 4 ECCs of two different cultures, while it strongly blocked the secretion of 5 MCCs.

Secretory responses of ECCs and MCCs upon stimulation with milder depolarizing stimuli: effects of BAY K 8644. Differences in the modes of quantal catecholamine release from chromaffin cells stimulated with low- and high-intensity

Table 1. Single-spike kinetic parameters calculated from the 75 K⁺-elicited secretory responses of ECCs and their MCCs

Cell Type	Events (Cells)	Rise Rate, pA/ms	I_{\max} , pA	$t_{1/2}$, ms	Q, pC	Decay 75–25, ms
ECC	1,806 (45)	52.17 \pm 4.78 (48.52)	45.78 \pm 3.21 (44.61)*	3.16 \pm 0.22 (2.86)*	0.18 \pm 0.01 (0.17)*	3.2 \pm 0.27 (2.75)*
MCC	1,419 (41)	50.61 \pm 4.70 (45.86)	74.22 \pm 5.79 (66.43)	5.19 \pm 0.37 (4.68)	0.53 \pm 0.05 (0.46)	5.3 \pm 0.48 (4.28)

Embryonic chromaffin cells (ECCs) and mothers' chromaffin cells (MCCs) (rows) were compared for each single spike parameter (columns) using the nonparametric Mann-Whitney rank sum test. Significant differences between both cell types are symbolized with asterisks in the ECC row. Data are presented as means \pm SE; median is also shown, below mean, between parentheses. Statistical tests were performed using the mean of at least 20 spikes per cell for each parameter. * $P < 0.001$.

Table 2. Kinetic parameters of feet calculated from the 75 K⁺-elicited secretory responses of ECCs and their MCCs

	Events (Cells)	I_{foot} , pA	t_{foot}	Q_{foot}
ECC	1,806 (45)	4.85 ± 0.34 (4.42)	3.44 ± 0.23 (3.05)*	0.02 ± 0.005 (0.02)*
MCC	1,419 (41)	5.59 ± 0.42 (5.18)	5.06 ± 0.31 (4.81)	0.04 ± 0.005 (0.03)

ECCs and MCCs (rows) were compared for each single spike parameter (columns) using the nonparametric Mann-Whitney rank sum test. Significant differences between both cell types (ECC row): * $P < 0.001$. Data are presented as means \pm SE; median is also shown, below mean, between parentheses. Statistical tests were performed using the mean of at least 20 spikes per cell for each parameter.

depolarizations have been reported (15). We, therefore, investigated whether differences in quantal secretion observed when using 75-K⁺ pulses were also seen with milder stimuli, for instance, 10-s pulses based in a solution containing 25 mM K⁺ (25K⁺). This K⁺ increase in the extracellular solution causes a 20-mV depolarization in current-clamped chromaffin cells (35). We also explored whether BAY K 8644, an L-type Ca²⁺ channel activator that at 0.3 μ M drastically enhances the release of catecholamines from chromaffin cells stimulated with mild K⁺ depolarizations (19), could differentially affect quantal secretion in ECCs and MCCs.

Figure 7A shows spike bursts obtained from an example ECC and MCC stimulated with three sequential 10-s 25 K⁺ pulses (P1, P2, P3) given at 5-min intervals. These three pulses produced similar burst responses in ECCs and MCCs (10 ECCs and 10 MCCs of 2 and 3 different cultures; data not shown). When BAY K 8644 was perfused for 1 min before and during P2, the 25 K⁺ elicited responses considerably augmented in both ECC (Fig. 7A, top) and MCC cells (bottom). This augmentation was reversible since burst secretion returned to levels of P1 upon BAY K 8644 washout (P3). Normalized

pooled data are shown in Fig. 7, B (ECC) and C (MCCs). In ECC, BAY K 8644 augmented over twofold the spike number and quantal content of burst secretion in ECCs. This increase was milder in MCCs, about 70%.

Kinetic analysis of spike events obtained in ECCs and MCCs stimulated with a 25-K⁺ pulse given in the absence or the presence of BAY K 8644. We used here the same criteria followed to select and analyze the spike events of secretory bursts elicited by 75-K⁺ pulses (Table 1) but here we demanded a minimum of 15 spikes per cell to perform the kinetic analysis not 20 due to the lower number of spikes emitted by the 25-K⁺ stimulus. Table 3 summarizes the kinetic parameters of spike secretory events recorded from cells stimulated with 25-K⁺ pulses, with or without BAY K 8644.

In ECCs stimulated with 25 K⁺, spikes were slower and smaller than those elicited by 75 K⁺, as judged by slower rise rates (26 vs. 52 pA/ms), smaller I_{max} (34 vs. 46 pA), greater width (4.8 vs. 3.2 ms), and slower decay (4.9 vs. 3.2 ms). However, the quantal size was similar with 25 K⁺ (0.19 vs. 0.18 pC). These differences were maintained in ECCs stimu-

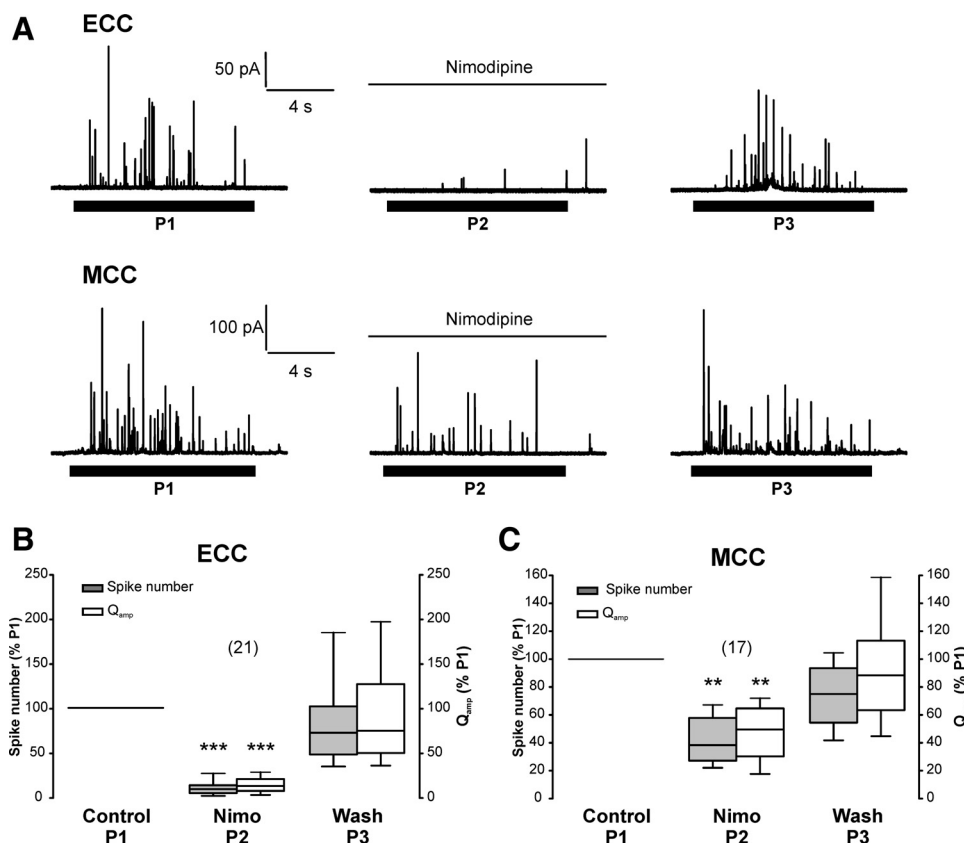
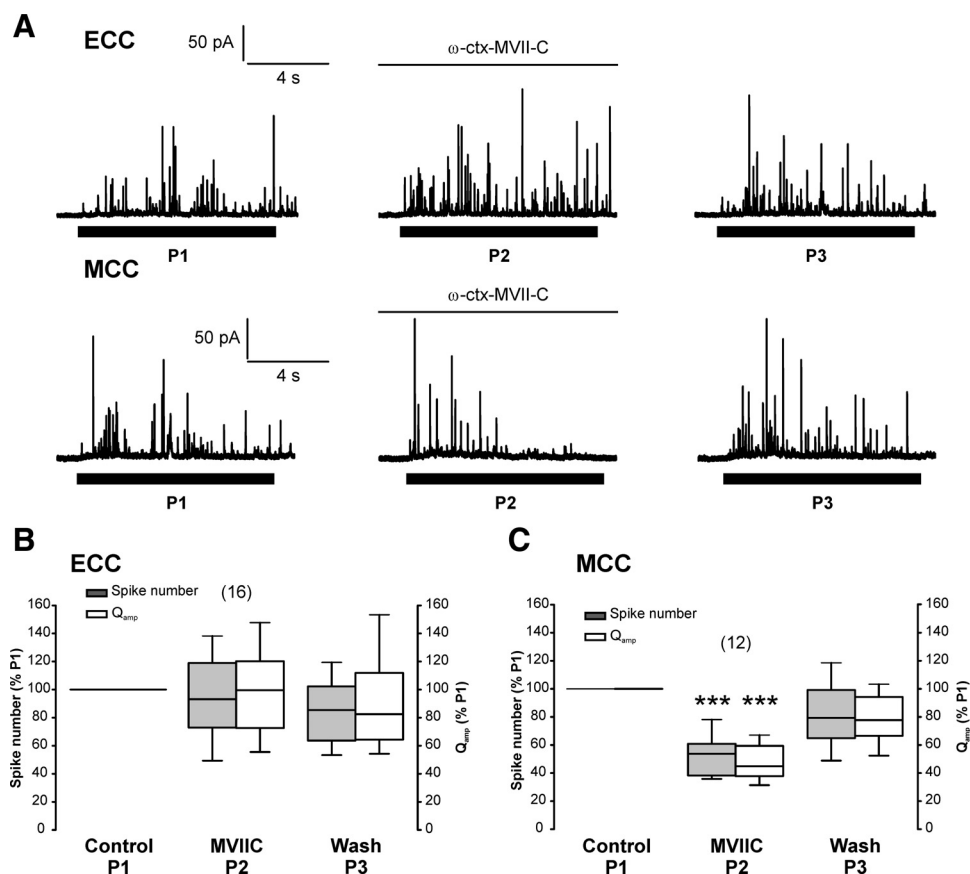


Fig. 5. Effect of nimodipine on the quantal secretory response elicited by 75-K⁺ pulses. Original recordings from example cells are shown in A (top, ECC; bottom, MCC). Notice how nimodipine (3 μ M) applied for 30 s before and coapplied with the 75-K⁺ pulse drastically and reversibly reduced the ECC secretion, whereas it only partially reduced the amperometric signal of the MCC. Results are pooled and plotted in B and C. Statistical parametric and nonparametric tests yield the same highly significant difference between the control and nimodipine responses. Nimodipine-elicited reduction of secretion is also statistically different between ECCs and MCCs. *** $P < 0.001$, ANOVA and ANOVA on ranks run on results from 21 ECCs from 6 different cultures and 17 MCCs from 4 cultures.

Fig. 6. Effect of ω -conotoxin MVIIC on the quantal secretory response elicited by 75-K⁺ pulses. The non-L-type Ca²⁺ channel blocker ω -conotoxin-MVIIC (MVIIC, 1 μ M) was perfused for 1 min previous to its coapplication with 75 K⁺. In the original recordings of A (top), the striking lack of effect of the toxin on ECCs can be observed. When it is compared with its effect on MCCs (bottom), it produced a marked reduction in the release spike number. Indeed, pooled ECCs results (B) show the absence of effect; the three stimulations elicit similar responses as assayed by integrated charge and number of spikes. In contrast, MCCs show a reduction of around 50% (C). *** $P < 0.001$ ANOVA on ranks sum test; 12 MCCs from 3 different cultures.



lated with 25 K⁺/BAY K 8644, suggesting that the release of greater number of spikes did not change their kinetics.

In MCCs stimulated with 25 K⁺, spikes were also slower and smaller than those elicited by 75 K⁺, as judged by slower rise rate (30 vs. 51 pA/ms), smaller I_{max} (48 vs. 74 pA), greater width (6.8 vs. 5.2 ms), and slower decay (7.2 vs. 5.3 ms) (Table 3). In contrast to ECCs, in MCCs the quantal size was smaller with 25 K⁺ when compared with 75 K⁺ (0.34 vs. 0.53 pC).

Whereas in ECCs spike kinetics was similar with 25 K⁺ or 25 K⁺/BAY K 8644, in MCCs there was a substantial variation in some of the kinetic parameters. The rise rate was slightly slower (38 pA/ms with 25 K⁺-BAY K 8644 vs. 33 pA/ms with 25 K⁺). However, I_{max} increased (72 vs. 48 pA), $t_{1/2}$ also augmented (8.1 vs. 6.8 ms), and decay time was elevated as well (8.6 vs. 7.2 ms), indicating that BAY K 8644 caused greater and wider spikes with an obvious higher quantal size (0.7 vs. 0.34 pC).

Table 3 also allows the comparison between ECC and MCC spikes produced by 25-K⁺ pulses, with or without BAY K 8644. Differences were particularly notorious when cell stimulation was performed in the presence of BAY K 8644. Although the rise rate was only slightly greater in MCCs compared with ECCs (30 vs. 26 pA/ms), I_{max} was more than doubled (72 vs. 34 pA), $t_{1/2}$ was prolonged by 80% (8.1 vs. 4.7 ms), decay time was augmented by 85% (8.6 vs. 4.8 ms), and the quantal size was enhanced more than threefold (0.7 vs. 0.20 pC). In the absence of BAY K 8644, spike parameters were also greater in MCCs when compared with ECCs but to a lesser extent (Table 3).

DISCUSSION

In this study we have found pronounced differences between the quantal catecholamine release responses triggered by K⁺ depolarization of chromaffin cells from rat embryos and their mothers. Such differences concern burst secretion, the shape of secretory events, the kinetics of individual secretory spikes, and the subtype of VDCCs involved in triggering exocytosis.

Cumulative burst secretion triggered by a 75-K⁺ pulse (measured as the integrated area of all spikes plus the wave envelope) was 35% higher in MCCs when compared with ECCs (Fig. 1C, right). This is consistent with the greater quantal size of individual spikes in MCCs. Considering that MCCs had a threefold greater quantal size than ECCs (Table 1) and that spike number was similar (Fig. 1C, left), the quantal content of the bulk secretion should have been greater than 35%. This discrepancy may be due to the inclusion of the wave envelope in the calculation of cumulative secretion of burst traces; such initial wave envelope was found more frequently in ECCs (43% of traces) than in MCCs (12% of traces). Additionally, ECCs exhibited as much as 42% of complex spikes compared with only 9% in MCCs. This may explain that the cumulative secretion ratio MCC/ECC (1.35) was substantially smaller than the MCC/ECC quantal size (≈ 3).

The different shapes of single secretory events and the distinct kinetics of single spikes favors the view for two different modes of exocytosis mediating the release of catecholamines from the adrenal medulla during fetal and adult life. Greater frequencies of double or triple spikes and of wave

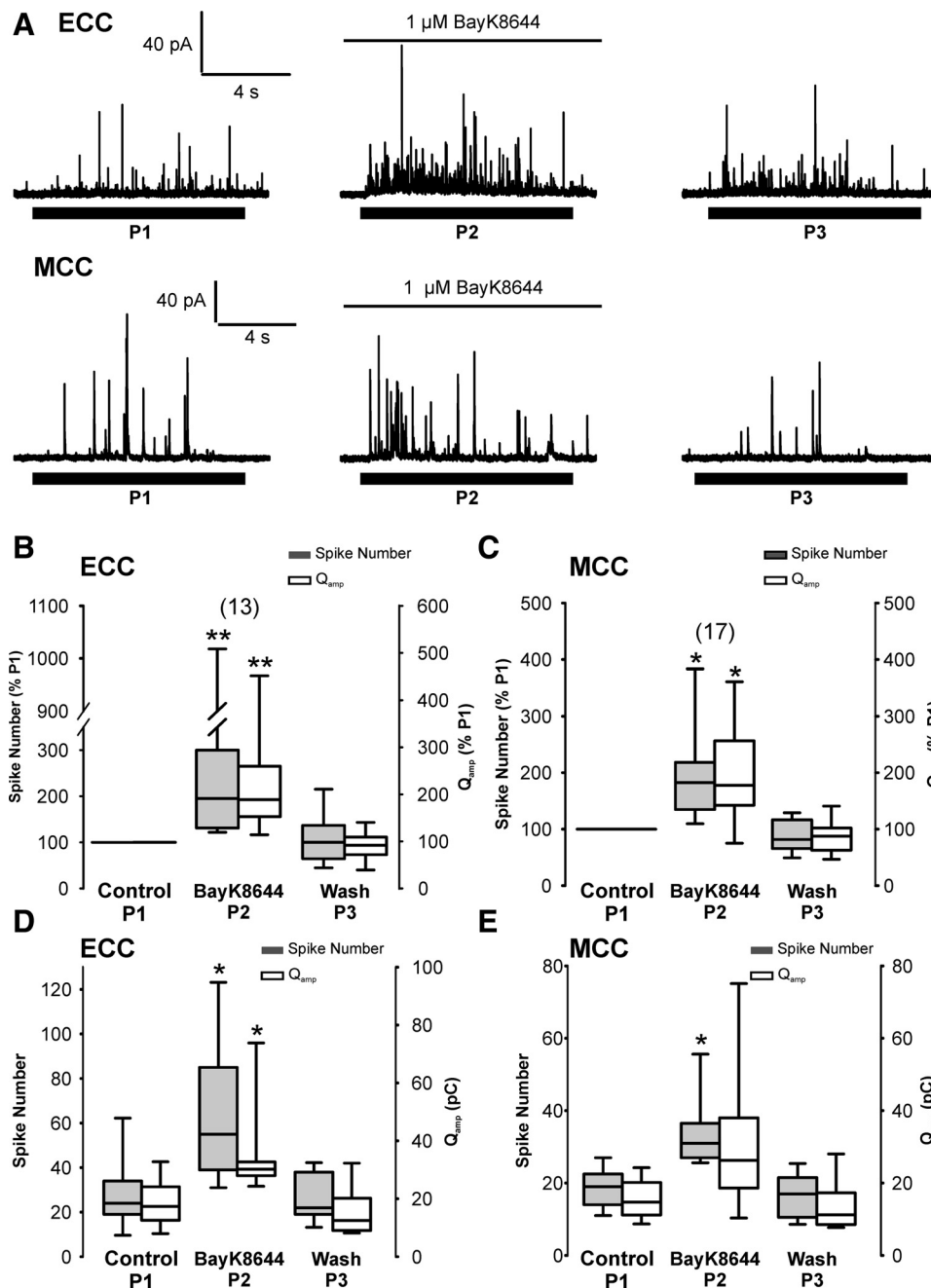


Fig. 7. Effect of BAY K 8644 on the quantal secretory response elicited by $25K^+$ pulses. **A**: example traces of the reversible enhancement in the $25K^+$ -elicited secretion produced by perfusion of BAY K 8644 in ECCs (*top*) as well as in MCCs. Quantitative normalized pooled results of these increments in spike number and cumulative charge are plotted in **B** and **C**. **D** and **E**: box plots of raw data from both parameters. Notice different scales in *left* and *right* axes in **B**, **C**, and **D** and *left* axis broken scale in **B**. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ANOVA on ranks sum test. 13 ECCs and 17 MCCs from 4 and 4 different cultures.

envelopes suggest a faster secretion in ECCs from a docked ready release vesicle pool (33).

The higher number of spikes with foot in MCCs (70%) than in ECCs (45%) (Fig. 2C) indicates that secretion must be slower in adult compared with fetal life. It is well established that the foot is due to a small fusion pore that permits the escape of small amounts of catecholamines from the vesicle and that the subsequent fast spike is due to full expansion of the fusion pore (9). The kinetic parameters (Table 1) also indicates that secretory spikes were equally faster as far as their rise rate was concerned in both ECCs and MCCs; however, smaller I_{max} , $t_{1/2}$ and decay time support a faster rate of catecholamine release in ECCs when compared with MCCs.

We found another curious difference between ECCs and MCCs upon stimulation with a lower K^+ concentration (25 mM). This milder depolarizing stimulus produced secretory events with kinetic parameters consistent with a slower secretion in both cell types. Upon increasing Ca^{2+} entry through L-VDCCs by using BAY K 8644, the kinetic parameters were enhanced in MCCs but not in ECCs (Table 3). Thus it seems that excess Ca^{2+} entry, either by applying a strong depolarizing stimulus (75 K^+) or a mild depolarizing stimulus (25 K^+) in the presence of BAY K 8644, altered the kinetic parameters of spike events in MCCs but not in ECCs. This suggests that in adult chromaffin cells the final steps of exocytosis are tightly regulated by Ca^{2+} entry

Table 3. Single-spike kinetic parameters calculated from the 25 K⁺-elicited secretory responses with and without BAYK, of ECCs and their MCCs

Cell Type	Events (Cells)	Rise Rate, pA/ms	<i>I</i> _{max} , pA	<i>t</i> _{1/2} , ms	Q, pC	Decay 75–25, ms
ECC (25K ⁺)	491 (25)	26.13 ± 3.30 (21.73)	34.32 ± 4.34 (25.95)	4.78 ± 0.32 (4.38)	0.19 ± 0.06 (0.13)	4.85 ± 0.41 (4.2)
ECC (25 K ⁺ + BAY K)	489 (13)	25.83 ± 3.8 (23.72)	30.57 ± 4.30 (23.92)	4.71 ± 0.24 (4.69)	0.20 ± 0.02 (0.17)	4.83 ± 0.26 (4.58)
MCC (25 K ⁺)	493 (27)	30.62 ± 5.44 (21.08)	47.91 ± 6.86 (31.67)	6.79 ± 0.69§ (5.77)	0.34 ± 0.05§ (0.24)	7.24 ± 0.79§ (7.72)
MCC (25 K ⁺ + BAY K)	397 (17)	38.72 ± 6.82 (26.24)	72.22 ± 12.4***† (43.94)	8.14 ± 0.71***† (7.98)	0.70 ± 0.18***† (0.61)	8.64 ± 1.00*** (7.91)

MCCs as well as ECCs with or without BAY K 8644 (BAY K) were compared. *I*_{max}, *t*_{1/2}, and Q were statistically different in MCCs (†*P* < 0.05; ††*P* < 0.01 Mann-Whitney rank-sum test), whereas kinetics of ECCs pretreated with BAY K did not differ from the 25-K⁺ pulse. All kinetic parameter except rise rate of BAY K-treated MCCs were statistically different from BAY K-treated ECCs (**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 Mann-Whitney rank-sum test). *t*_{1/2}, Q, and Decay 75–25 differed significantly between ECCs and MCCs stimulated with 25-K⁺ pulses (§*P* < 0.05 Mann-Whitney rank-sum test).

(1, 15); this regulation does not seem to be established in immature and denervated fetal cells.

A last drastic difference between the regulation of quantal catecholamine release in ECCs and MCCs concerns the distinct roles of L- and non-L-(N/PQ) VDCCs in controlling the secretory responses elicited by 75-K⁺ pulses. The relative contribution of each channel type to the whole cell Ca²⁺ current (*I*_{Ca}) in adult rat chromaffin cells has been previously studied (16). L channels account for 50–60% of *I*_{Ca}, which also control a similar proportion of the secretory response (26). On the other hand, ECCs express both high-voltage activated Ca²⁺ channels and low-voltage activated (T-type) channels, but only the first contribute to catecholamine secretion in embryonic chromaffin cells (5). No studies are available to discern how the different VDCCs contribute to provide the necessary Ca²⁺ to elicit exocytosis during cell depolarization. In the present study we found that in ECCs, L channels dominated the control of secretory responses elicited by 75 K⁺ pulses, N/PQ channels making little contribution. This was not the case for MCCs where L- and non-L channel types contributed near equally to the control of secretion (Table 4). It could be argued that during fetal life, only L-type channels are expressed; however, in preliminary experiments using the patch-clamp technique in its whole cell configuration, we have found that the inward Ca²⁺ currents have components that are equally sensitive to 3 μM nimodipine and 1 μM MVIIC (data not shown); this suggests that ECCs do express functional N/PQ channels that are not capable, however, of providing the necessary Ca²⁺ to trigger the release of catecholamines in these cells. The possibility that L channels are coupled to the exocytotic machinery more tightly than N/PQ channels deserves further studies. An alternative possibility is that in ECCs, N/PQ channels are inactivated more rapidly than L

channels, as happens to be the case in bovine chromaffin cells (22, 54). It is noteworthy that secretion activity remained along the 10-s duration of the 75-K⁺ pulse (Fig. 1, A and B), although it exhibited a tendency to decline with time (Fig. 4A). It is likely that N/PQ channels, but not L channels, are already inactivated within the first second of the 75-K⁺ stimulus (21, 54). Although this argument seems sound, we should consider that the long stimulus with 75 K⁺ must also preferentially inactivate the N and PQ channels. Thus the different inactivation rates of L and non-L channels may not explain their distinct contribution to secretion control in ECCs and MCCs.

Our study has physiological and clinical implications. The adrenal medulla of the fetal and neonatal organism plays a more relevant role in adaptation to stress than in the adult (47). In fact, in newborn humans there is a pronounced surge of adrenal catecholamine release at delivery (27, 28); this may assist the neonate in adapting respiratory, cardiovascular, and metabolic functions to demands of extrauterine life (24). Thus it is not surprising that interfering with this catecholamine surge is associated with decreased survival potential (27, 28, 41). In this context, our results suggest that treatment of pregnant women with L-type Ca²⁺ channel blockers, particularly with 1,4 dihydropyridine derivatives such as nifedipine that crosses the placental barrier (13), may be formally contraindicated because they can drastically reduce the catecholamine surge occurring during delivery and at birth. In fact tocolysis with nifedipine has caused fetal death (53). This has been attributed to severe hypotension caused by nifedipine (34); however, our results suggest that blockade of fetal adrenal catecholamine release and impairment of adaptation to stress may drastically augment the risk of fetal toxicity and even fetal death. Furthermore, our results also suggest that an L-type Ca²⁺ channel activator could be a good therapeutic tool

Table 4. Contribution of L- and non-L-Ca²⁺ channels to secretion ECCs and MCCs

	Control Spike Number, %		Control Q _{amp} , %	
	Non-L (3 μM Nimodipine)	L (1 μM ω-ctx-MVII-C)	Non-L (3 μM Nimodipine)	L (1 μM ω-ctx-MVII-C)
ECC	11.83 ± 1.98† (10.00)	101.62 ± 6.95*† (93.17)	14.63 ± 2.03† (13.53)	104.12 ± 8.24*† (102.31)
MCC	42.14 ± 4.09* (38.30)	54.65 ± 6.56* (53.74)	47.15 ± 4.53* (49.56)	51.66 ± 5.07* (38.15)

Groups were compared using Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks and Bonferroni's multiple comparisons versus control group post hoc test to find which groups differed statistically from ECC nimodipine (* symbol) or MCC nimodipine († symbol). Both, Q_{amp} and spike number yielded similar results. MCC MVIIC group, ECC MVIIC group, and MCC nimodipine were statistically different from ECC nimodipine (**P* < 0.001). ECC MVIIC and ECC nimodipine groups were statistically different from MCC nimodipine group (†*P* < 0.001) in both number of spikes and Q_{amp} parameters. Mother MVIIC and nimodipine groups were statistically equal. Even when the data did not fulfill the equal variance assumption, a parametric ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test against control group was also performed resulting in exactly the same results. Data are presented as means ± SE and also as medians inside parentheses.

to decrease the risk of sudden infant death syndrome (SIDS). The clinical use of one activator such as BAY K 8644 is precluded by its potent vasoconstriction, cardiac inotropic, and arrhythmogenic effects (40). However, there are other calcium channel agonists that cause little vasoconstriction and cardiac inotropic effects. For instance, we synthesized a 1,4-dihydropyridine derivative named PCA50941 (50) that caused little coronary vasoconstriction and cardiac inotropic effect compared with BAY K 8644 (37). Furthermore, PCA50941 activated adrenal medullary catecholamine release (30); whereas BAY K 8644 reduced coronary blood flow, augmented arterial pressure, left ventricular pressure, and dP/dt , PCA50941 did not change these parameters (14). Thus an L-type channel agonist with this pharmacological profile could be of therapeutic interest to treat SIDS.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Fundación Teófilo Hernando for continued support.

GRANTS

This study was supported by the following grants to A. G. Garcia: SAF 2006-03589, Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN); RETICS-RD 06/0026, Instituto de Salud Carlos III (MICINN); and S-SAL-0275-2006, Comunidad Autónoma de Madrid; Agencia Laín Entralgo, Comunidad Autónoma de Madrid, Spain.

REFERENCES

- Ales E, Tabares L, Poyato JM, Valero V, Lindau M, Alvarez de Toledo G. High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat Cell Biol* 1: 40–44, 1999.
- Amatore C, Arbault S, Bonifas I, Bouret Y, Erard M, Ewing AG, Sombers LA. Correlation between vesicle quantal size and fusion pore release in chromaffin cell exocytosis. *Biophys J* 88: 4411–4420, 2005.
- Amatore C, Arbault S, Bouret Y, Guille M, Lemaitre F, Verchier Y. Invariance of exocytotic events detected by amperometry as a function of the carbon fiber microelectrode diameter. *Anal Chem* 81: 3087–3093, 2009.
- Bournaud R, Hidalgo J, Yu H, Girard E, Shimahara T. Catecholamine secretion from rat foetal adrenal chromaffin cells and hypoxia sensitivity. *Pflügers Arch* 454: 83–92, 2007.
- Bournaud R, Hidalgo J, Yu H, Jaimovich E, Shimahara T. Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. *J Physiol* 537: 35–44, 2001.
- Colliver TL, Hess EJ, Ewing AG. Amperometric analysis of exocytosis at chromaffin cells from genetically distinct mice. *J Neurosci Methods* 105: 95–103, 2001.
- Comline RS, Silver M. Development of activity in the adrenal medulla of the foetus and new-born animal. *Br Med Bull* 22: 16–20, 1966.
- Comline RS, Silver M. The development of the adrenal medulla of the foetal and new-born calf. *J Physiol* 183: 305–340, 1966.
- Chow RH, von Ruden L, Neher E. Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* 356: 60–63, 1992.
- de Diego AM, Arnaiz-Cot JJ, Hernandez-Guijo JM, Gandia L, Garcia AG. Differential variations in Ca^{2+} entry, cytosolic Ca^{2+} and membrane capacitance upon steady or action potential depolarizing stimulation of bovine chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 194: 97–109, 2008.
- Douglas WW. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol* 34: 453–474, 1968.
- Douglas WW, Rubin RP. The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J Physiol* 167: 288–310, 1963.
- Ferguson JE, 2nd Schutz T, Pershe R, Stevenson DK, Blaschke T. Nifedipine pharmacokinetics during preterm labor tocolysis. *Am J Obstet Gynecol* 161: 1485–1490, 1989.
- Fernandez N, Garcia JL, Lopez MG, Garcia AG, Dieguez G. PCA50941, a new 1,4-dihydropyridine, reverses endothelin-induced cardiogenic shock in the anesthetized goat. *Life Sci* 62: 1933–1942, 1998.
- Fulop T, Radabaugh S, Smith C. Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 25: 7324–7332, 2005.
- Gandia L, Borges R, Albillos A, Garcia AG. Multiple calcium channel subtypes in isolated rat chromaffin cells. *Pflügers Arch* 430: 55–63, 1995.
- Gandia L, Lara B, Imperial JS, Villarroya M, Albillos A, Maroto R, Garcia AG, Olivera BM. Analogies and differences between omega-conotoxins MVIIC and MVIID: binding sites and functions in bovine chromaffin cells. *Pflügers Arch* 435: 55–64, 1997.
- Garcia AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L, Borges R, and Garcia-Sancho J. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 86: 1093–1131, 2006.
- Garcia AG, Sala F, Reig JA, Viniegra S, Frias J, Fonteriz R, Gandia L. Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature* 309: 69–71, 1984.
- Gootman N, Gootman PM, Crane LA, Buckley BJ. Integrated cardiovascular responses to combined somatic and visceral afferent stimulation in newborn piglets. *Biol Neonate* 36: 70–77, 1979.
- Hernandez-Guijo JM, Gandia L, de Pascual R, Garcia AG. Differential effects of the neuroprotectant lubeluzole on bovine and mouse chromaffin cell calcium channel subtypes. *Br J Pharmacol* 122: 275–285, 1997.
- Hernandez-Guijo JM, Maneu-Flores VE, Ruiz-Nuno A, Villarroya M, Garcia AG, Gandia L. Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca^{2+} channels in chromaffin cells: role of mitochondria. *J Neurosci* 21: 2553–2560, 2001.
- Hille B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, MA: Sinauer, 2001, chapt. 1, p. 1–22.
- Jones HM, Cummings AJ, Setchell KD, Lawson AM. A study of the disposition of alpha-methyl dopa in newborn infants following its administration to the mother for the treatment of hypertension during pregnancy. *Br J Clin Pharmacol* 8: 433–440, 1979.
- Kawagoe KT, Zimmerman JB, Wightman RM. Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *J Neurosci Methods* 48: 225–240, 1993.
- Kim SJ, Lim W, Kim J. Contribution of L- and N-type calcium currents to exocytosis in rat adrenal medullary chromaffin cells. *Brain Res* 675: 289–296, 1995.
- Lagercrantz H, Bistoletti P. Catecholamine release in the newborn infant at birth. *Pediatr Res* 11: 889–893, 1977.
- Lagercrantz H, Slotkin TA. The “stress” of being born. *Sci Am* 254: 100–107, 1986.
- Machado DJ, Montesinos MS, Borges R. Good practices in single-cell amperometry. *Methods Mol Biol* 440: 297–313, 2008.
- Montiel C, de la Fuente MT, Vinet R, del Valle M, Gandia L, Artalejo AR, Garcia AG. Interactions between Ca^{2+} , PCA50941 and Bay K 8644 in bovine chromaffin cells. *Eur J Pharmacol* 268: 293–303, 1994.
- Mosharov EV, Sulzer D. Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nat Methods* 2: 651–658, 2005.
- Munoz-Cabello AM, Toledo-Aral JJ, Lopez-Barneo J, Echevarria M. Rat adrenal chromaffin cells are neonatal CO_2 sensors. *J Neurosci* 25: 6631–6640, 2005.
- Neher E. Vesicle pools and Ca^{2+} microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20: 389–399, 1998.
- Oei SG. Calcium channel blockers for tocolysis: a review of their role and safety following reports of serious adverse events. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 126: 137–145, 2006.
- Orozco C, Garcia-de-Diego AM, Arias E, Hernandez-Guijo JM, Garcia AG, Villarroya M, and Lopez MG. Depolarization preconditioning produces cytoprotection against veratridine-induced chromaffin cell death. *Eur J Pharmacol* 553: 28–38, 2006.
- Pappano AJ. Ontogenetic development of autonomic neuroeffector transmission and transmitter reactivity in embryonic and fetal hearts. *Pharmacol Rev* 29: 3–33, 1977.
- Priego J, Gonzalez-Morales MA, Cillero FJ, Villarroya M, Sunkel C, de Casa-Juana MF, Lopez MG, Artalejo CR, de Pascual R, Garcia AG. PCA50941, a novel Ca^{2+} channel agonist. *Eur J Pharmacol* 243: 25–34, 1993.
- Rico AJ, Prieto-Lloret J, Gonzalez C, Rigual R. Hypoxia and acidosis increase the secretion of catecholamines in the neonatal rat adrenal medulla: an in vitro study. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C1417–C1425, 2005.
- Rosenthal RN, Slotkin TA. Development of nicotinic responses in the rat adrenal medulla and long-term effects of neonatal nicotine administration. *Br J Pharmacol* 60: 59–64, 1977.

40. Schramm M, Thomas G, Towart R, Franckowiak G. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca^{2+} channels. *Nature* 303: 535–537, 1983.
41. Seidler FJ, Slotkin TA. Adrenomedullary function in the neonatal rat: responses to acute hypoxia. *J Physiol* 358: 1–16, 1985.
42. Seidler FJ, Slotkin TA. Non-neurogenic adrenal catecholamine release in the neonatal rat: exocytosis or diffusion? *Brain Res* 393: 274–277, 1986.
43. Seidler FJ, Slotkin TA. Non-neurogenic adrenal catecholamine release in the neonatal rat: exocytosis or diffusion? *Brain Res* 393: 274–277, 1986.
44. Seidler FJ, Slotkin TA. Ontogeny of adrenomedullary responses to hypoxia and hypoglycemia: role of splanchnic innervation. *Brain Res Bull* 16: 11–14, 1986.
45. Slotkin TA. Maturation of the adrenal medulla. I. Uptake and storage of amines in isolated storage vesicles of the rat. *Biochem Pharmacol* 22: 2023–2032, 1973.
46. Slotkin TA. Maturation of the adrenal medulla. II. Content and properties of catecholamine storage vesicles of the rat. *Biochem Pharmacol* 22: 2033–2044, 1973.
47. Slotkin TA, Seidler FJ. Stress in the fetus and newborn. *Adv Exp Med Biol* 245: 283–294, 1988.
48. Sombers LA, Hancher HJ, Colliver TL, Wittenberg N, Cans A, Arbault S, Amatore C, Ewing AG. The effects of vesicular volume on secretion through the fusion pore in exocytotic release from PC12 cells. *J Neurosci* 24: 303–309, 2004.
49. Sorensen JB, Nagy G, Varoqueaux F, Nehring RB, Brose N, Wilson MC, Neher E. Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* 114: 75–86, 2003.
50. Sunkel CE, de Casa-Juana MF, Santos L, Gomez MM, Villarroya M, Gonzalez-Morales MA, Priego JG, Ortega MP. 4-Alkyl-1,4-dihydropyridines derivatives as specific PAF-acether antagonists. *J Med Chem* 33: 3205–3210, 1990.
51. Thompson RJ, Farragher SM, Cutz E, Nurse CA. Developmental regulation of O_2 sensing in neonatal adrenal chromaffin cells from wild-type and NADPH-oxidase-deficient mice. *Pflügers Arch* 444: 539–548, 2002.
52. Thompson RJ, Jackson A, Nurse CA. Developmental loss of hypoxic chemosensitivity in rat adrenomedullary chromaffin cells. *J Physiol* 498: 503–510, 1997.
53. van Veen HW, Callaghan R, Soceneantu L, Sardini A, Konings WN, Higgins CF. A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. *Nature* 391: 291–295, 1998.
54. Villarroya M, Olivares R, Ruiz A, Cano-Abad MF, de Pascual R, Lomax RB, Lopez MG, Mayorgas I, Gandia L, Garcia AG. Voltage inactivation of Ca^{2+} entry and secretion associated with N- and P/Q-type but not L-type Ca^{2+} channels of bovine chromaffin cells. *J Physiol* 516: 421–432, 1999.
55. Wang X, Thiagarajan R, Wang Q, Tewolde T, Rich MM, Engisch KL. Regulation of quantal shape by Rab3A: evidence for a fusion pore-dependent mechanism. *J Physiol* 586: 3949–3962, 2008.
56. Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ Jr, and Viveros OH. Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10754–10758, 1991.



ARTÍCULO 2

Distinct contribution of mitochondria to the regulation of calcium signalling and exocytosis in rat embryo and mother chromaffin cells

***Stefan Vestring^{1,4}, *José C. Fernández-Morales^{1,2}, Fernando Padín^{1,2}, Diego Castro Musial¹, Enrique Calvo-Gallardo^{1,2}, Antonio G. García^{1,2,3}**

¹Instituto Teófilo Hernando, ²Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain. ³Servicio de Farmacología Clínica, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario de la Princesa, UAM, Madrid, Spain, ⁴Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Germany.

Running head:

Mitochondria, calcium signalling and exocytosis in rat embryo chromaffin cells

Contact information:

Antonio G. García

Instituto Teófilo Hernando

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Avda. Arzobispo Morcillo, 4

28029, Madrid (Spain)

Phone number: +34914973120/21

Fax number: +34914975380

e-mail: agg@uam.es

****Equal contributors***

ARTÍCULO 3

Two Steps of the Hypoxia-Induced Catecholamine Secretion from Rat Embryo Chromaffin Cells are Differentially Controlled by High-Voltage Activated Calcium Channel Subtypes

José C. Fernández-Morales^{1,2}, Antonio G. García^{1,2,3}, Antonio M.G. de Diego^{1,2}

¹Instituto Teófilo Hernando, ²Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain. ³Servicio de Farmacología Clínica, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario de la Princesa, UAM, Madrid, Spain.

Running head:

Calcium channels and hypoxia catecholamine release during fetal life

Contact information:

Antonio G. García
Instituto Teófilo Hernando
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid
Avda. Arzobispo Morcillo, 4
28029, Madrid (Spain)
Phone number: +34914973120/21
Fax number: +34914975380
e-mail: agg@uam.es

ABSTRACT

During fetal and perinatal life chromaffin cells of the adrenal medulla respond to hypoxia with a catecholamine surge that contributes to survival and adaptation at those early periods of life. The mechanism underlying such Ca^{2+} -dependent response is unknown. Here we have found in voltage clamped rat embryo chromaffin cells (RECCs) that their whole-cell Ca^{2+} current (I_{Ca}) is carried both by L- and non-L (N and PQ) high voltage activated Ca^{2+} channels. While L channel blockers nifedipine and nimodipine inhibited by near 90% the hypoxia-elicited secretion of quantal catecholamine release (the HIS response), combined N and PQ channel blockade caused only 35 % inhibition. Of note was the observation that the HIS response had an initial rapid rate of single-vesicle release events, and an ensuing more sustained slower rate of release. The results are compatible with the view that the HIS response is initially controlled by rapid-inactivating N and PQ VDCCs as well as slowly inactivating L channels, while the more sustained phase is controlled by only the L-subtype of VDCCs.

KEYWORDS:

Embryo chromaffin cells, calcium channels, hypoxia, catecholamine release.

ABBREVIATIONS:

VDCCs: voltage-dependent Ca^{2+} channels; RECCs: rat embryo chromaffin cells; Q_{amp} : cumulative amperometric charge; HIS: hypoxia-induced secretion of catecholamines

INTRODUCTION

During fetal and perinatal life chromaffin cells of the adrenal gland respond to hypoxia with a catecholamine surge that contributes to survival and adaptation at those early periods of life [1,2]. The fact Cd^{2+} ions inhibit the hypoxia-induced secretion (the HIS response) [3,4] suggest the involvement of Ca^{2+} entry through voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCCs) in the triggering of such response.

Mature innervated chromaffin cells from adult rats express various subtypes of high-voltage activated (HVA) VDCCs at the following relative densities: 50 % L-subtype (α_{1D} , Cav1.3), 30 % N-subtype (α_{1B} , Cav2.2) and 20 % PQ-subtype (α_{1A} , Cav2.1) [5]. On the other hand, immature non-innervated chromaffin cells from rat embryos (RECCs) also express HVA channels [6] although the relative proportion of L, N and PQ channel expression remains unknown in these cells. Low-threshold activated (LVA) T-type currents have also been recorded in about 50 % of RECCs [6] and in chromaffin cells of adrenal slices from neonate rats [7].

Concerning the role of VDCCs in regulating the HIS response of immature rat chromaffin cells, a study suggests T channels play a protagonist role; by triggering so-called low-threshold exocytosis [8], this conclusion was reached on the basis that Ni^{2+} and pimozone caused the blockade of T currents and the HIS response [7]. The fact nifedipine blocks the HIS response of neonate rat chromaffin cells [9,10] suggests that L channels are also implicated in the regulation of such response. Here we present the first study aimed at dissecting out pharmacologically the subcomponents of the whole-cell Ca^{2+} current (I_{Ca}) in RECCs and to determine the role of each HVA Ca^{2+} channel subtype in regulating the HIS response. Our results support the view of a sequential

contribution of rapid-inactivating N/PQ channels and slow-inactivating L channels, in triggering the fast and the slower sustained phases of the HIS response.

MATERIALS AND METHODS

All experimental procedures with animals have been carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and were performed following the rules approved by the Ethical Committee for the care and use of animals, of the Medical School, Autonomous University of Madrid, Spain, in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes and with the Spanish Real Decreto of October 10 2005 (RD 1201/2005). All efforts were made to minimize animal suffering.

Chromaffin cells were obtained from 18-day-old (E18) rat embryos using a previously described protocol [11]. Cells were seeded on poly-D-lysine-coated coverslips of one 12-well plates (for patch-clamp and secretion experiments). Experiments were carried out in cells that were kept in a water-saturated incubator at 37°C and a 5 % CO₂ atmosphere for 1 to 2 days.

For patch-clamp recording of Ca²⁺ currents (I_{Ca}) the perforated-patch mode of the patch-clamp technique was used [12], using amphotericin B as permeating agent [13]. I_{Ca} were recorded at room temperature (25 °C) as previously described for BCCs [14].

Experimental conditions for cell stimulation and recording of single amperometric spike events were as described [11,15]. For hypoxia experiments the

reservoirs of the perfusion system were continuously bubbled with either 95% air / 5 % CO₂ (normoxia) or 95 % N₂ / 5% CO₂ (hypoxia/anoxia) and were covered, except for a small hole where the needle carrying the gas was introduced. A minimum of 30 min bubbling elapsed before the initiation of the experiment, to allow time enough for cell equilibration with the solution. The percentage of O₂ was measured using an Ecoscan Do 6 oximeter (Eutech Instruments, Nijkerk, The Neatherlands). Within the reservoir, the solution reached complete anoxia; in the perfusion system outlet, O₂ percentage oscillated between 5 and 10%. The perfused solution replaced the surroundings of the cell by this strongly hypoxic solution in less than 1 s.

Products to make saline solutions, nimodipine and nifedipine were purchased to Sigma (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Tetrodotoxin citrate was from Ascent Scientific (Bristol, UK). ω -conotoxin MVIIC, ω -conotoxin GVIA and ω -agatoxin IVA were from Peptide Institute (Peptanova GmbH, Germany). DMEM was from GIBCO (Scotland, UK), fetal bovine serum was from PAA laboratories (Pasching, Austria), and papain was from Worthington (Lakewood, NJ).

I_{Ca} amplitude was measured at the maximum peak current during the 50-ms depolarising pulse. Only the cells that held up the entire protocol (control, drug and wash) were included in the statistics. We used a Student's t test for comparison between control and drug I-V curves at each depolarizing voltage step. Data are represented as mean \pm S.E. of at least 3 different cultures.

For amperometric recordings, data analysis was carried out on a personal computer using Excel (Microsoft, Redmond, WA) and IgorPro (Wavemetrics, Lake Oswego OR), as previously described [11]. We found that most groups didn't fit well to

normal distributions, thus two nonparametric statistical tests were used: Mann-Whitney's rank sum test to compare two samples or Kruskal-Wallis' repeated measures one-way ANOVA on ranks for more than two groups; in the case of the finding of statistically significant differences, Dunnett's multiple comparisons versus control group post hoc test was applied to determine which groups were statistically different. All statistical analysis was performed using SPSS 13 (SPSS, Chicago, IL) and MS Excel (Microsoft, Redmond, WA). A *P* value equal or smaller than 0.05 was taken as the limit of significance.

RESULTS AND DISCUSSION

Fig. 1A shows typical current traces from an example RECC, composed of an initial fast inactivating Na^+ current (I_{Na}) that preceded the I_{Ca} trace. At the 3 μM saturating concentration to block chromaffin cell L current [16], nimodipine halved I_{Ca} ; I_{Ca} inactivation was similar in the two traces. Fig. 1B shows two current records from a second cell; at the 2 μM saturating concentration, ω -conotoxin MVIIC (MVIIC) is known to completely block the N and PQ components of chromaffin cell I_{Ca} [16]; at this concentration, MVIIC halved I_{Ca} . Of note was the fact the MVIIC-insensitive I_{Ca} component (L current) underwent no inactivation, as described to be the case for L-type Ca^{2+} currents of rat chromaffin cells [5]. Combined nimodipine plus MVIIC caused near full blockade of I_{Ca} , while 100 μM Cd^{2+} practically abolished it (Fig. 1C). Integrated I_{Ca} normalised to cell capacitance (Q_{Ca} / cell capacitance) in 25 RECCs, amounted to 0.88 ± 0.07 pC/pF. Q_{Ca} (total Ca^{2+} entry) carried by L channels was 60.1 ± 4.7 % of the total normalised current, while the fraction of current carried through N/PQ channels accounted for 28.2 ± 7.2 (Fig. 1D). Pooled results from 12 cells with the combination of

nimodipine and MVIIC showed an I_{Ca} blockade of 84.7 ± 2.1 %. Cd^{2+} elicited 92.1 ± 2.2 % of I_{Ca} blockade. The blocker-resistant residual current may be attributed to T channels [6,7].

The relative contribution of VDCC subtypes to the HIS response was explored in RECCs subjected to three 1-min hypoxia pulses that initially triggered a burst of single vesicle exocytotic events, followed by more infrequent spikes (example trace of Fig. 2A). In the presence of nimodipine only few spikes were visible at the beginning of the hypoxia stimulus (example trace of Fig. 2B). Upon nimodipine washout, the HIS response recovered near fully (Fig. 2C). Normalised data in terms of cumulative total secretion (Qamp) and spike number per hypoxia stimulus (P1, P2, P3) indicated a Qamp blockade of $82 \pm 3\%$ and a spike number blockade of $88 \pm 2\%$ (Fig. 2D). Similar results were achieved with nifedipine (Fig. 3A) that at $1 \mu M$ is known to target L channels of chromaffin cells with high selectivity [16,17]. N-type channel blocker ω -conotoxin GVIA (GVIA) reduced the HIS response by around 15 % (Fig. 3B) while PQ channel blocker ω -agatoxin IVA (Aga) caused around 16 % inhibition (Fig. 3C). Additivity of blockade was observed with combined GVIA plus Aga that elicited 35 % inhibition of the HIS response (Fig. 3D).

These results suggest that the concerted action of L- as well as N- and PQ-type HVA calcium channels could be regulating the provision of the Ca^{2+} necessary to trigger the HIS response of RECCs. However, L-type channels seem to play a more dominant role, as also proven to be the case in fetal ovine chromaffin cells [3,18].

If all VDCC subtypes intervene in the regulation of the HIS response, we must address the question on whether such intervention takes place simultaneously or

sequentially upon sustained hypoxia exposure. From a physiopathological point of view it should be considered that during fetal life, during delivery and at neonatal periods the embryo first and the neonate thereafter, undergo hypoxic stress periods that could last for minutes. In our experiments we exposed the RECCs to 1-min periods of hypoxia; we found first a few-second delay and then a burst of spikes that was followed by a slower rate of discharge of single-vesicle exocytotic events. To illustrate this behaviour the results of an analysis of spike number and their relative frequency distribution at 10-s intervals of the HIS response from 74 cells, is graphed in Fig. 4. The initial 10-s period contained 25.1 ± 2.4 secretory spikes (Fig. 4, panel A) and the subsequent 10-s periods contained gradually reduced spike numbers. Spike frequency also decayed with time along the 60-s hypoxia exposure (Fig. 4, panel A, B).

This pattern of release could be compatible with a sequential contribution to the initiation and the long-term maintenance of the HIS response of respectively, the rapid-inactivating N/PQ and the slower inactivating L-type VDCCs [19,20]. Rapid-inactivating low-conductance T channels [21] could contribute to the HIS response by increasing cell excitability, favouring depolarisation and the firing of action potentials [7]. This may be mediated by different types of Ca^{2+} -dependent K^+ channels that are known to be inhibited by hypoxia in rat neonatal chromaffin cells to cause their depolarisation [22]. In so doing, the ensuing firing of action potentials [7] will recruit the HVA channels to first initiate a burst of secretory spikes (L, N and PQ channel control) followed by a sustained lower rate of secretion (L channel control).

In conclusion, the adrenal catecholamine surge occurring during hypoxia at early life stages may be initially triggered by Ca^{2+} entry through all HVA L/N/PQ VDCCs; the ensuing sustained secretion seems to be controlled by slow-inactivating L channels.

T and Ca^{2+} -dependent K^{+} channels may control cell excitability and the firing of action potentials, serving to recruit HVA channels to provide the necessary Ca^{2+} to trigger the two-steps HIS response in RECCs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the following grants to AGG from Spanish Institutions: (1) SAF 2010-21795, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain; (2) RENEVAS-RETICS-RD06/0026, Instituto de Salud Carlos III, Spain; (3) CABYCIC (Cátedra Bioibérica / UAM for Inflammation and Cell Protection). We thank the continued support of Fundación Teófilo Hernando, Madrid, Spain.

AUTHOR CONTRIBUTIONS:

Participated in research design: Antonio G. García, Antonio M.G. de Diego, José C. Fernández-Morales

Conducted experiments: José C. Fernández-Morales, Antonio M.G. de Diego

Performed data analysis: José C. Fernández-Morales, Antonio M.G. de Diego

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Antonio G. García, José C. Fernández-Morales, Antonio M.G. de Diego

REFERENCES

- [1] F.J. Seidler, T.A. Slotkin, Non-neurogenic adrenal catecholamine release in the neonatal rat: exocytosis or diffusion?, *Developmental Brain Research* (1986) 274-277.
- [2] T.A. Slotkin, F.J. Seidler, Adrenomedullary catecholamine release in the fetus and newborn: secretory mechanisms and their role in stress and survival, *J Dev Physiol* 10 (1988) 1-16.
- [3] M.B. Adams, G. Simonetta, I.C. McMillen, The non-neurogenic catecholamine response of the fetal adrenal to hypoxia is dependent on activation of voltage sensitive Ca^{2+} channels, *Brain Res Dev Brain Res* 94 (1996) 182-189.
- [4] M. Garcia-Fernandez, R. Mejias, J. Lopez-Barneo, Developmental changes of chromaffin cell secretory response to hypoxia studied in thin adrenal slices, *Pflugers Arch* 454 (2007) 93-100.
- [5] L. Gandia, R. Borges, A. Albillos, A.G. Garcia, Multiple calcium channel subtypes in isolated rat chromaffin cells, *Pflugers Arch* 430 (1995) 55-63.
- [6] R. Bournaud, J. Hidalgo, H. Yu, E. Jaimovich, T. Shimahara, Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells, *J Physiol* 537 (2001) 35-44.

- [7] K.L. Levitsky, J. Lopez-Barneo, Developmental change of T-type Ca^{2+} channel expression and its role in rat chromaffin cell responsiveness to acute hypoxia, *J Physiol* 587 (2009) 1917-1929.
- [8] E. Carbone, A. Marcantoni, A. Giaccipoli, D. Guido, V. Carabelli, T-type channels-secretion coupling: evidence for a fast low-threshold exocytosis, *Pflugers Arch* 453 (2006) 373-383.
- [9] R.J. Thompson, A. Jackson, C.A. Nurse, Developmental loss of hypoxic chemosensitivity in rat adrenomedullary chromaffin cells, *J Physiol* 498 (Pt 2) (1997) 503-510.
- [10] Y. Takeuchi, N. Mochizuki-Oda, H. Yamada, K. Kurokawa, Y. Watanabe, Nonneurogenic hypoxia sensitivity in rat adrenal slices, *Biochem Biophys Res Commun* 289 (2001) 51-56.
- [11] J.C. Fernandez-Morales, L. Cortes-Gil, A.G. Garcia, A.M. de Diego, Differences in the quantal release of catecholamines in chromaffin cells of rat embryos and their mothers, *Am J Physiol Cell Physiol* 297 (2009) C407-418.
- [12] R. Horn, A. Marty, Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method, *J Gen Physiol* 92 (1988) 145-159.
- [13] J. Rae, K. Cooper, P. Gates, M. Watsky, Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B, *J Neurosci Methods* 37 (1991) 15-26.

- [14] A.M. de Diego, J.J. Arnaiz-Cot, J.M. Hernandez-Guijo, L. Gandia, A.G. Garcia, Differential variations in Ca^{2+} entry, cytosolic Ca^{2+} and membrane capacitance upon steady or action potential depolarizing stimulation of bovine chromaffin cells, *Acta Physiol (Oxf)* 194 (2008) 97-109.
- [15] R.M. Wightman, J.A. Jankowski, R.T. Kennedy, K.T. Kawagoe, T.J. Schroeder, D.J. Leszczyszyn, J.A. Near, E.J. Diliberto, Jr., O.H. Viveros, Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 10754-10758.
- [16] A.G. Garcia, A.M. Garcia-De-Diego, L. Gandia, R. Borges, J. Garcia-Sancho, Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells, *Physiol Rev* 86 (2006) 1093-1131.
- [17] A. Marcantoni, V. Carabelli, V. Comunanza, H. Hoddah, E. Carbone, Calcium channels in chromaffin cells: focus on L and T types, *Acta Physiol (Oxf)* 192 (2008) 233-246.
- [18] D.J. Keating, G.Y. Rychkov, M.L. Roberts, The contribution of voltage-gated Ca^{2+} currents to K^{+} channel activation during ovine adrenal chromaffin cell development, *Int J Dev Neurosci* 27 (2009) 357-363.
- [19] M. Villarroya, R. Olivares, A. Ruiz, M.F. Cano-Abad, R. de Pascual, R.B. Lomax, M.G. Lopez, I. Mayorgas, L. Gandia, A.G. Garcia, Voltage inactivation of Ca^{2+} entry and secretion associated with N- and P/Q-type but not L-type Ca^{2+} channels of bovine chromaffin cells, *J Physiol* 516 (Pt 2) (1999) 421-432.

- [20] J.M. Hernandez-Guijo, V.E. Maneu-Flores, A. Ruiz-Nuno, M. Villarroya, A.G. Garcia, L. Gandia, Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca^{2+} channels in chromaffin cells: role of mitochondria, *J Neurosci* 21 (2001) 2553-2560.
- [21] E. Carbone, H.D. Lux, A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones, *Nature* 310 (1984) 501-502.
- [22] R.J. Thompson, C.A. Nurse, Anoxia differentially modulates multiple K^{+} currents and depolarizes neonatal rat adrenal chromaffin cells, *J Physiol* 512 (Pt 2) (1998) 421-434.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Pharmacological isolation of the fraction of whole-cell inward Ca^{2+} current (I_{Ca}), carried by L-type and non-L-type (N/PQ) high VACCs in rat embryo chromaffin cells (RECCs). Cells were voltage-clamped at -60 mV (the resting membrane potential of RECCs) and perfused with an extracellular solution containing 2 mM Ca^{2+} under the perforated patch configuration of the patch-clamp technique. Pulses of 100 ms duration to -10 mV from a holding potential of -60 mV were applied to ECCs before (control) and 2 min after the perfusion of 3 μM nimodipine (nimo), 1 μM ω -conotoxin-MVIIC (MVIIC), both drugs together (nimo + MVIIC) or 100 μM Cd^{2+} as indicated in the example I_{Ca} traces from sample cells in panels A, B and C. Arrow in panel A indicates the fast-inactivating Na^{+} current (I_{Na}), that was truncated to better see I_{Ca} . Q_{Ca} was estimated as the area of I_{Ca} , selecting the fraction of current from 5 ms after the initiation of the pulse (to avoid I_{Na} contamination) to the end of the pulse. Pooled data on Q_{Ca} of n cells of at least 3 different cultures (parentheses) are shown in

panel D (means \pm SEM). Ordinate indicates the % blockade of Q_{Ca} elicited by nimo, MVIIC, combined nimo + MVIIC and Cd^{2+} . *** $P < 0.001$ with respect to control.

Figure 2: Effect of blocking L VDCCs on hypoxia-induced secretion of catecholamine (the HIS response). Panels A, B and C show original records of the HIS response of an example RECC, sequentially stimulated with 3 hypoxia pulses (P1, P2, P3). Nimodipine (nimo 3 μ M) was perfused for 2 min previous to its co-application with hypoxia; the strong inhibition produced by the drug can be seen in panel B when compared with the control pulse (A); only a few spike were produced at the beginning of hypoxia. The drug effect was fully reversible (C). Pooled data (mean \pm SEM) of 12 cells of 3 different cultures are shown in panel D. *** $P < 0.001$ with respect to P1, Mann-Whitney's rank-sum test.

Figure 3: Effect of blocking L, N and PQ VDCCs on hypoxia-induced secretion of catecholamines. The experiments were performed following the protocol used for nimodipine (Fig. 2), by applying three sequential hypoxia stimuli given at 5-min intervals within the same cell (P1, P2 and P3). Pooled results of the effect of 1 μ M nifedipine (A), 1 μ M ω -conotoxin-GVIA (GVIA) (B), 1 μ M ω -agatoxin-IVA (Aga) (C) and the combination of 1 μ M Aga plus 1 μ M GVIA (D); blockers were perfused in all cases for 2 min previous to its co-application with the hypoxia stimulus. These treatments achieved an almost total blockade of secretion in the case of nifedipine and a partial blockade of secretion for application of one or the other toxin separately. Note that upon toxin washout the partial secretion blockade remained (P3). Data are means \pm SEM of the number of cells and different cultures shown in parentheses. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ with respect to P1 of the combination.

Figure 4: Spike number and frequency histogram of the quantal catecholamine release responses of RECCs exposed to 1-min hypoxia stimuli. A, number of spikes per 10-s period (ordinate) within a 60-s hypoxia stimulus. B, normalized spike frequency per 10-s periods (ordinate) in % of the total number of spikes within a 60-s hypoxia stimulus. Data are means \pm SEM of hypoxia stimuli given to 74 cells from 16 different cultures. * $P < 0.05$ with respect to the first 10-s period of hypoxia. ANOVA on ranks sum test.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

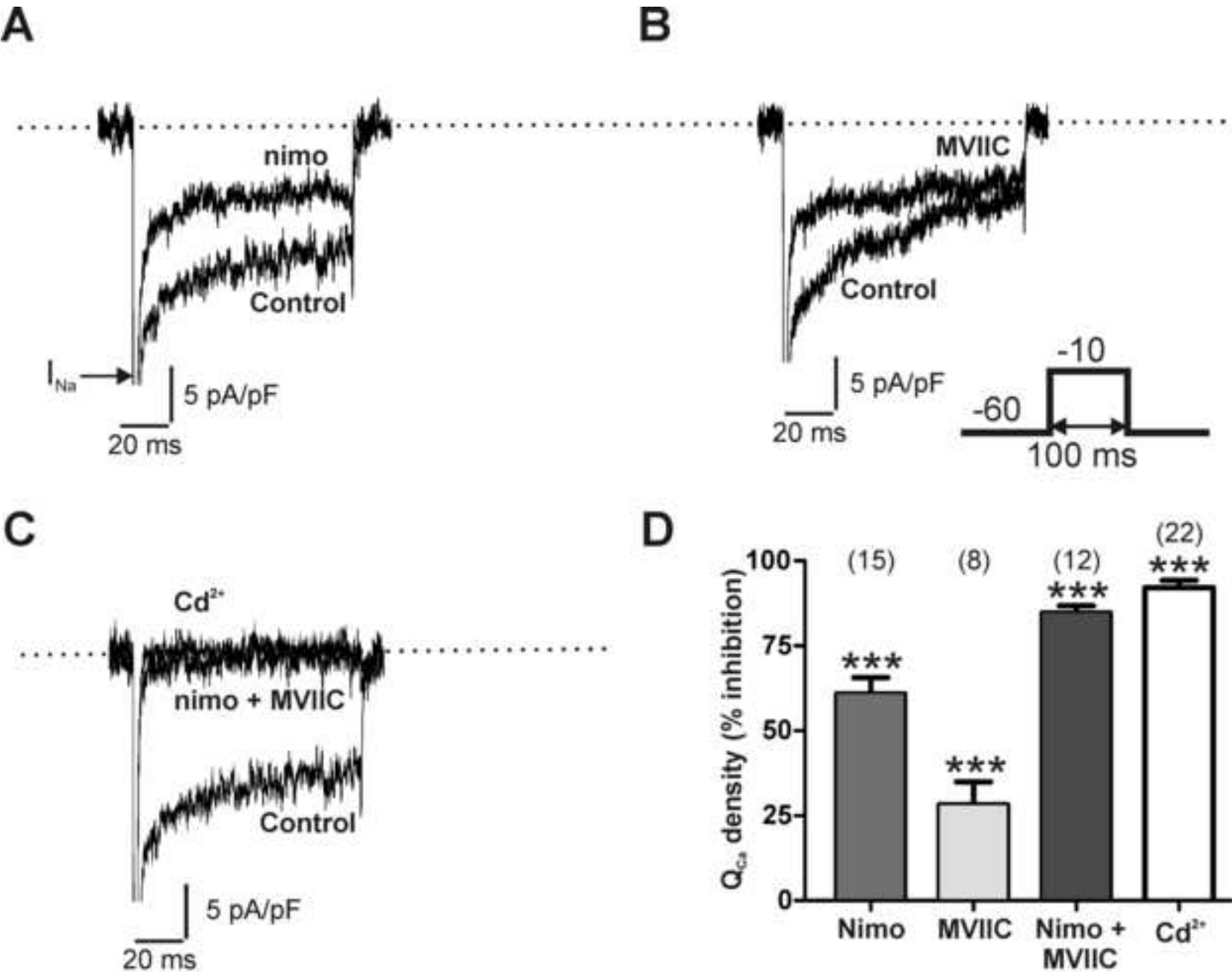


Figure 1

Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

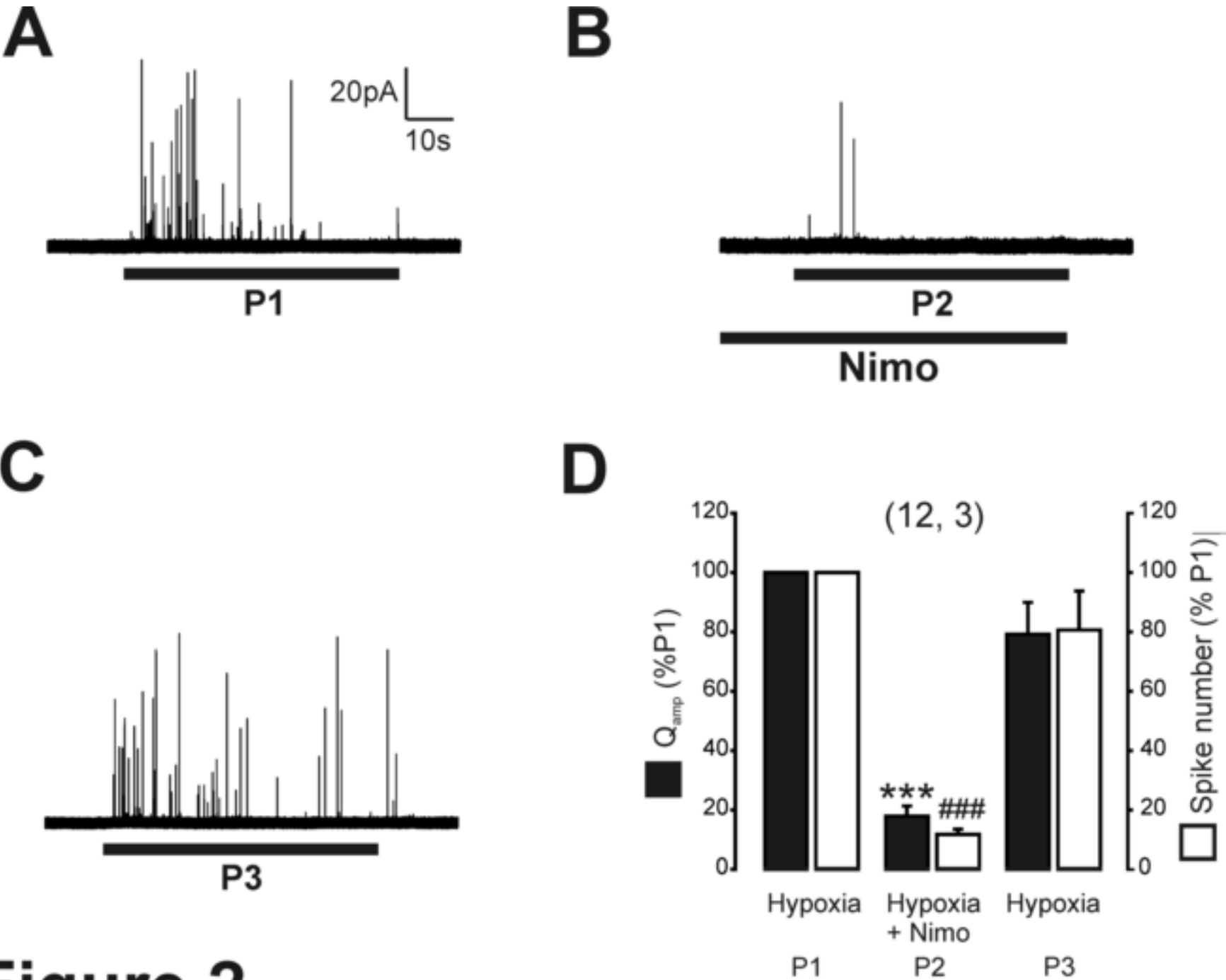


Figure 2

Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

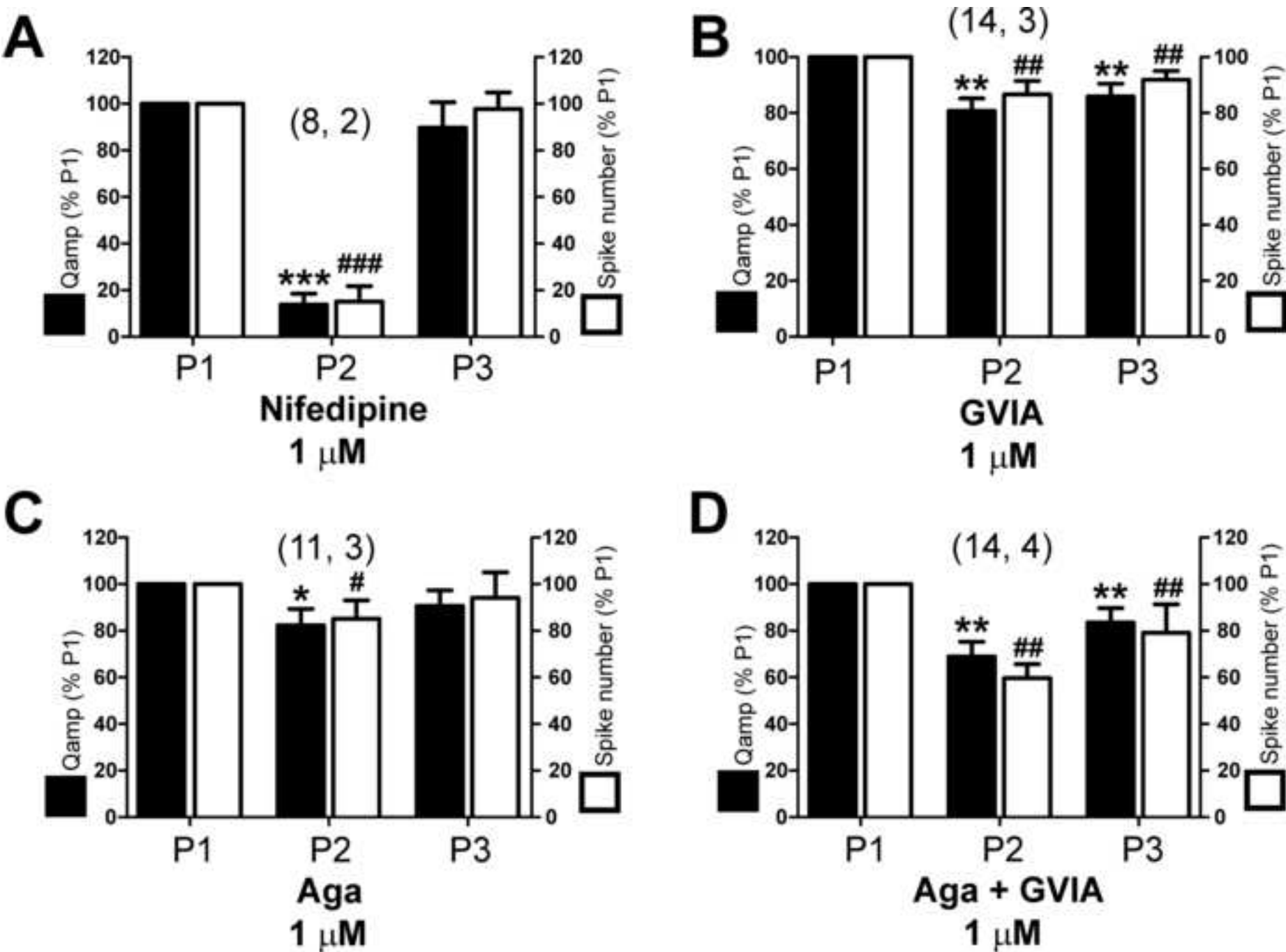


Figure 3

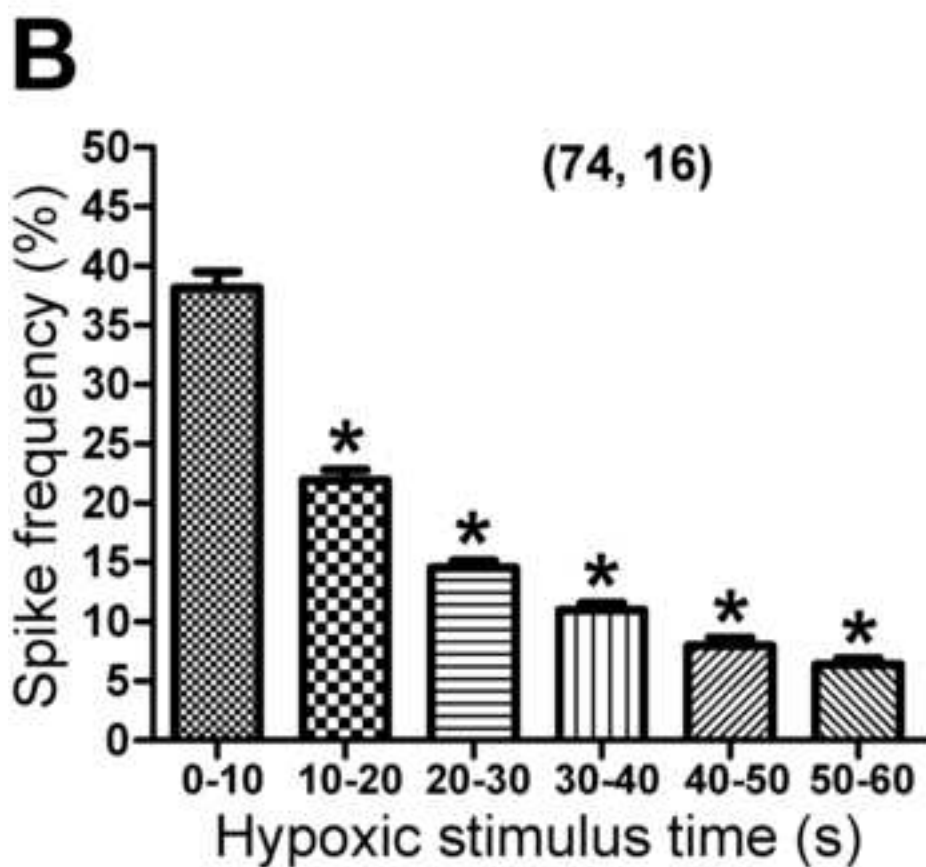
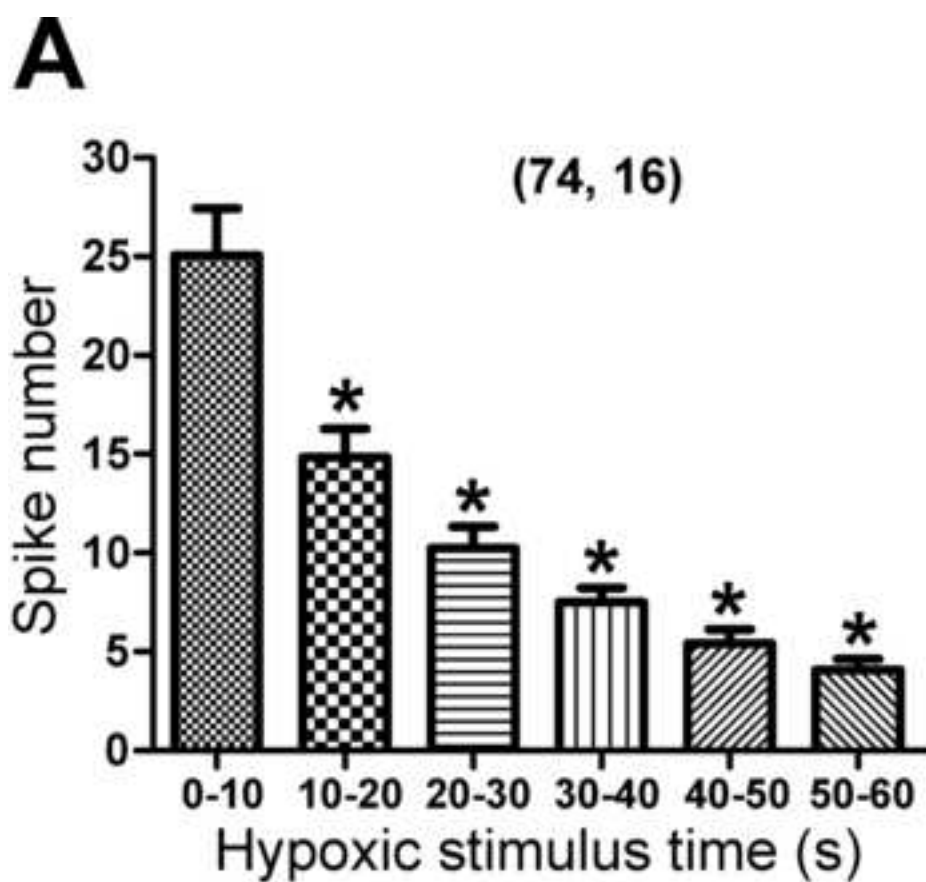


Figure 4

ARTÍCULO 4

Developmental changes of exocytotic quantal events and vesicle pools in rat chromaffin cells

^{1,2,*}Antonio M.G. de Diego, ^{1,2,*}José Carlos Fernández-Morales, ^{1,2,3}Silvia Lorrio, ⁴María
Elena Díaz, ^{1,2,5}Antonio G. García,

¹Instituto Teófilo Hernando, ²Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad
de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Spain. ³Hospital La Paz Health
Research Institute-IdiPAZ, Madrid, Spain ⁴Departamento de Informática, Escuela
Técnica Superior de Ingeniería, Universidad de Valencia, Spain, ⁵Servicio de
Farmacología Clínica, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario de la
Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Spain.

*Equal contributors

Running Head: Developmental changes of exocytosis in chromaffin cells

Corresponding author: Antonio M. G. de Diego,

Present address: UCL Ear Institute, 332 Grays inn Road. WC1X 8EE. London, UK.

E-mail: antoniomiguel.garcia@gmail.com

Abstract

We have performed a structure and function study of exocytosis in rat chromaffin cells at two stages of development, embryonic gestation day 18 and adult rats of 6 months old. Amperometric secretory spikes in embryo chromaffin cells were evoked by their native secretagogue, hypoxia; single-spike kinetics was analyzed; this adds the more physiological hypoxia to other secretory stimuli investigated in mature and immature cells in a previous work (Fernandez-Morales *et al*, 2009). Transmission electron microscopy images were obtained to quantify the number of large dense cored vesicles (LDCV), their area and distance to plasma membrane. Increments in membrane capacitance (ΔC_m) produced by a paired depolarizing pulse protocol served to assay the size of the releasable pools of vesicles. We found: i) Amperometric quantal size was constant in immature chromaffin cells – 0.2 pC - while it was larger and stimulus-dependent in adults. ii) This was consistent with an estimated 1.2 times LDCV larger radius of MCCs as assayed by morphometry. iii) LDCVs were 6.5 times more abundant in adults, and only 15% of them were located within 300 nm of the plasmalemma; in contrast most immature LDCVs (63%) appeared in that area. And iv) considering the difference in LDCV area, the readily and immediately releasable pools inferred from ΔC_m were up to two times larger in MCCs. Taken together, these data suggest that changes in vesicle and quantal size, releasable pool organization and quantal content may underly the dissimilar patterns of exocytosis found between developed and undeveloped chromaffin cells.

Introduction

The current knowledge on the mechanisms of regulated exocytosis has amply benefited from the use of chromaffin cells of the adrenal medulla as experimental model. In adult mammals, they release catecholamines upon action potential driven membrane depolarization that help keep the cardiovascular tone in basal conditions

(20). In situations of acute stress a large discharge of catecholamines from chromaffin cells sparks off the "fight or flight" response. But during fetal and perinatal life the adrenal medulla probably plays a more relevant role in adaptation to stress. Thus, many of the changes needed for the adaptation of the newborn to extrauterine life depend on a surge of catecholamines released by chromaffin cells by a non-neurogenic mechanism, which main mediator is hypoxia (50). Furthermore, interfering with the catecholamine surge decreases survival potential of the fetus and the newborn under hypoxic and other stressful conditions (33, 48, 50). This non-neurogenic release is lost upon maturation. Much research has been carried out to elucidate the mechanisms of both, the non-neurogenic response as well as the form in which it disappears as it is substituted by the adult phenotype. As a result of this research several mechanism involved in the hypoxia-elicited secretion (HIS) were found such as the modulation of SK and K_{ATP} potassium channels (31, 57), the activation of high and low-voltage activated calcium channels (8, 34), or the formation of reactive oxygen species in the mitochondria (37, 56).

The development of other components of the exocytotic process itself in these cells has received less attention. For instance secretory vesicles organize within the cytoplasm in pools defined by their promptness to undergo exocytosis (41, 53, 58). Their size and number undergoes developmental changes in neurons resulting in different secretory response patterns to similar stimulus (39, 54). In chromaffin cells, Coupland and Tomlinson (1989) (13) showed in a detailed ultrastructure study an increase in the number and size of LCDV. But functional correlates of this observation had not been pursued further.

In this context we reported that various K-elicited levels of depolarization produced amperometric events with smaller quantal size in embryo chromaffin cells (ECCs) than in their adult counterparts (23). The kinetics of these spikes and their release rate also showed remarkable differences. In the present study we have

investigated possible factors underlying these disparities and used more physiological approaches such as the induction of secretion by hypoxia in embryo chromaffin cells, and the analysis of TEM pictures of adrenal gland ultrathin sections obtained from fixative-perfused whole animals, preserving thus the native structure of the tissue. We further investigate developmental changes in vesicle pools assayed with capacitance and paired depolarizing pulse protocols. Preliminary reports of this work have been presented (18, 19).

Keywords: Chromaffin cell, hypoxia, exocytosis, electron microscopy, amperometry

Materials and Methods

Animals

All experimental procedures with animals were performed following the rules of and approved by the Ethical Committee of *Universidad Autónoma de Madrid*, Medical School's for the care and use of animals in research, in accordance with the European Community Council Directive of November 24 1986 (86/609/EEC) and with the Spanish *Real Decreto* of October 10, 2005 (RD 1201/2005). Rats were housed individually under controlled temperature and lighting conditions with food and water provided *ad libitum*.

Electron microscopy

For electron microscopy experiments, 3-4 month old adult pregnant rats were anesthetized with isoflurane and fetuses (E18) were extracted and placed on an ice-cold surface. Rats and fetuses were then transcardially perfused with saline solution followed by fixative consisting on freshly prepared 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Adrenals were then immersed for another 2 h in the fixation medium at 4°C and osmicated with 1% osmium tetroxide in

0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), dehydrated through a series of increasing ethanol concentrations, and embedded in Epon. Ultrathin sections of 60 nm were prepared and 1024x1024 resolution pictures taken at 12000x magnification in a JEOL 100 TEM.

Cell culture

Chromaffin cells were obtained from 18-day-old (E18) rat embryos by a protocol previously described for mice (52) with some modifications as previously described (23). Experiments were carried out in cells incubated for 1 to 3 days *in vitro* that were kept in a water-saturated incubator at 37°C and a 5% CO₂ atmosphere.

Recording of whole-cell perforated-patch clamp calcium currents and Capacitance

Calcium currents were recorded using standard patch-clamp techniques with an EPC-10 amplifier and PULSE software (HEKA-elektronics, Lambrecht, Germany) on the stage of a Nikon Diaphot microscope equipped with Narishige MWH-3 micromanipulators (Japan), as previously described (17). All recordings were carried out using the perforated patch mode (35) with amphotericin B as permeating agent (44). Pipettes of 2-4 MΩ were filled with a solution containing (in mM): 145 glutamic acid, 1 MgCl₂, 8 NaCl and 10 HEPES, pH 7.2 with CsOH. The bath solution was composed of: 137 mM NaCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 5 KCl, 10 HEPES, and 10 glucose, pH 7.35 with NaOH. Recordings began when series resistance decreased below 20 MΩ. No series resistance compensation was applied. Variations in cell membrane capacitance measurements were assayed with the Lindau-Neher technique (36) as implemented in HEKA's PULSE software (HEKA, Lambrecht, Germany). We used a 1Khz sinusoidal wave, of 70 mV peak to peak amplitude.

Size estimation of secretory vesicle pools

We used the method described by Gillis et al (1996) to estimate the size of vesicle pools. Briefly, for readily releasable pool (RRP) estimates two 100-ms

depolarizing pulses were given 100 ms apart. For these experiments extracellular Ca^{2+} was 5 mM. Depolarizations were adjusted to match Ca^{2+} current sizes of both pulses (25). The capacitance increments (ΔCm) produced were subtracted from similar recordings obtained in the presence of Cd^{2+} in order to remove as much as possible the capacitance artifact produced by Na^+ channel gating (29). ΔCm was calculated by subtracting the mean of a 20 ms capacitance window just after 25 ms of the end of the depolarizing pulse. The size of the immediately releasable pool (IRP) was obtained reducing the depolarizing pulses time to 10 ms. Estimates of minimum (B_{min}) and maximum (B_{max}) vesicle pool sizes were obtained using the following formulae (25, 59): $B_{\text{min}} = \Delta\text{Cm}_1 + \Delta\text{Cm}_2$ and $B_{\text{max}} = (\Delta\text{Cm}_1 + \Delta\text{Cm}_2) / (1 - (\Delta\text{Cm}_1 / \Delta\text{Cm}_2)^2)$, where ΔCm_1 and ΔCm_2 are the capacitance increments produced by the first and second depolarization respectively.

Amperometric recordings of quantal catecholamine release

Catecholamines released from single cells were measured by amperometry (60). Electrodes were made as previously described (30). We used a homemade amperometer connected to an interface (PowerLab/4SP ADInstruments.) that digitized the signal at 10 kHz delivering it to an Apple McIntosh Power PC computer that displayed it within the Chart V. 4.2 software (ADInstruments). A 730-mV potential was applied to the electrode with respect to an AgCl ground electrode. External solutions were rapidly exchanged by means of a five-way superfusion system with a common outlet driven by electrically controlled valves (The Lee Company, Westbrook, CT, USA) by an electronic controller (UAM workshop). The bath solution contained (in mmol/l): 120 NaCl, 2 KCl, 26 NaHCO_3 , 1.18 KH_2PO_4 , 11 glucose, 1.19 MgSO_4 , 2 CaCl_2 . At the time of experiment, drug stock solutions were freshly dissolved into this solution. The reservoirs of the perfusion system were continuously bubbled with either 95%air/5% CO_2 (normoxia) or 95% N_2 /5% CO_2 (hypoxia/anoxia). A minimum of 30 min bubbling elapsed before experiment beginning to allow time enough for gas

equilibration. The percentage of O₂ was measured using an Ecoscan Do 6 oximeter (Eutech Instruments, Nijkerk, The Netherlands). Within the reservoir the solution reached complete anoxia. In the perfusion system outlet, O₂ percentage oscillated between 5 and 10%. The perfused solution replaced the surroundings of the cell in less than 1 s.

Data analysis and statistics

To analyze electron microscopy microphotographs a custom program was written using Matlab software (MathWorks Inc., USA) to automatically detect number and location and quantify LDCV parameters, i.e, the number, area and distance from plasma membrane (22). Digital image-processing techniques provide objective and highly repeatable way of detection. Manual counting is time-consuming and open to observer error. A preprocessing stage consisting in defining a region of interest (ROI), by delineating the plasma membrane, the cell nucleus, and the most prominent organelles is carried out. After TEM calibration with a grid, the resolution of the digitized images was measured to be 10.75 nm per pixel.

A marker for each granule is obtained by applying a correlation with a Gaussian filter with different sizes varying from 10 to 22 pixels and considering the point with maximal correlation. Then we applied a region growing technique restricted to the watershed division lines avoiding objects from encroaching on other granules which were in close proximity (49). A subsequent analysis of the shape and grey-level characteristics of each candidate results in the final segmentation enabling granules to be discriminated from other spurious objects in the background cytosol. This includes measures of eccentricity, ratio between major and minor axis length and mean and coefficient of variation of the gray levels. All detection and analysis was double-blind and posterior statistical analysis using Receiver Operating Characteristic (ROC) curves showed the automated detection to have 92% accuracy. The computer took less than 10 seconds to process an image. The program is available at <http://www.uv.es/tracs>.

Once the program had been run, the image was digitally zoomed in and carefully inspected to check for false or missed detections. These were pointed to the program that recalculated parameters. Means of each measured parameter per cell were pooled and statistical tests performed using a cell as a unit of analysis (as opposed to pooling together all LDCVs, to compute mean distance to plasma membrane) since this kind of analysis is more robust (see below). As our main interest was to compare LDCV parameters between undeveloped and mature CCs, we did not attempt to make any correction to infer true vesicle size and report most morphometry results as ratios of MCC to ECC parameters.

Amperometric recordings were analyzed as previously described (23). Single spike analysis was carried out by means of an Igor macro available from the Sulzer lab, Columbia University, NY (written by E. Mosharov, <http://www.sulzerlab.org/download.html>). Recordings were filtered off-line at 1 kHz, this allowed the reliable detection of spikes of an amplitudes equal to or larger than 5 pA. The median of all spikes for every parameter was calculated cell by cell. Tests for statistical differences between groups were performed using one value per cell and per parameter, which is a more robust means of statistical testing (12, 38).

Data are presented in box-and-whiskers plots: the line inside the box depicts median values, the size of the box is given by the distance between the 25th and the 75th percentiles; "whiskers" indicate 10th and 90th percentile. Means \pm SE are also indicated throughout the text and/or in the figure legends. Data sets were tested for normality. When not normally distributed, nonparametric tests were used. Statistical analysis was performed using SigmaPlot (Systan Software Inc, USA) and MS Excel (Microsoft, Redmond, USA). P-values equal or smaller than 0.05 were considered statistically significant. Skew was calculated as the third standardized moment about the mean.

Chemicals

All chemicals were purchased to Sigma (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). DMEM was from GIBCO (Scotland, UK), fetal bovine serum was obtained from PAA laboratories (Pasching, Austria), and papain was from Worthington (Lakewood, NJ, USA).

Results

Kinetic characteristics of hypoxia induced amperometric events

A few studies have used amperometry as an assay of HIS in rat immature CCs (8, 24, 34) but, to our knowledge, only the study of Garcia-Fernandez et al (2007) had made a study of one kinetic parameter (quantal size). A detailed description of single amperometric spikes elicited by hypoxia was therefore lacking in these cells. In the frame of the marked differences between ECCs and MCCs secretory events we described in a previous report (23), we considered important to explore whether the spike characteristics peculiar to ECCs were held when elicited by the physiological stimulus of hypoxia.

We challenged ECCs for a 60-s period superfusing a hypoxic solution. Spikes appeared during the whole length of the stimulus, sometimes with an initial burst followed by less frequent spikes, other times in a slower maintained frequency scattered along the whole 60-s as shown in Figure 1A. Fig. 1 also shows examples of 25K⁺ and 75K⁺-elicited secretion (B and C) for comparison. We performed a single spike kinetic analysis on the HIS recordings which results are shown in Tables 1 and 2. For the sake of clarity we have added to these tables the parameters calculated in our previous report for 25K⁺ and 75K⁺ stimuli (Fernandez-Morales *et al.*, 2009). HIS spikes resemble those produced by a mild depolarization with 25K⁺ (Fig 1D, E, F). Thus, rise rate, maximum current amplitude (I_{max}), halfwidth ($t_{1/2}$), decay time and spike charge (Q_{amp}) values are similar, being HIS spikes slightly wider and 25K⁺ slightly taller (Table 1). Given that severe hypoxia induces a mild depolarization in chromaffin cells (8–10, 57), which leads to a moderate Ca²⁺ entry (37) it is reasonable that HIS patterns

resemble catecholamine release patterns induced by 25K^+ depolarization (around 20 mV in bovine chromaffin cells (42). When the stimulus applied was stronger (75K^+) all parameters changed abruptly: spikes doubled their I_{max} , became thinner (reduction of half-width) and much faster (with a doubled rise rate compared to 25K^+ or HIS, and a reduced decay time). These kinetic changes however, resulted in a constant mean charge per spike in the three types of stimulation (approximately 0.2 pC/spike).

Some spikes are preceded by a so called “foot”, a transient small oxidation current previous to the full amperometric spike (11) (Fig. 1E, F). The kinetics of these feet were also analyzed (Table 2). In this case, feet elicited by 25K^+ or 75K^+ stimulus were similar, although the number of feet was significantly smaller in 25K^+ (31% vs 43%). In contrast HIS feet were smaller and longer.

These data suggest that ECCs are capable of regulating the mode of exocytotic release. This regulation may be dependent on Ca^{2+} (4), or the phosphorylation activity of certain kinases as has been suggested for dopaminergic neurons of the ventral midbrain (51).

A morphometric analysis I. Developmental change in LDCV size.

Modes of secretion may explain the changes in ECCs amperometric spike kinetics elicited by different secretagogues. But when we compared ECC quantal event kinetics with those of their mature mother (MCC), we found consistent pronounced differences even though spikes were elicited by the same kind of stimulus (23). A salient disparity was that in MCCs Q_{amp} was 1.8 to 2.9 times that of ECCs depending on the stimulus used. Bigger LDCVs in MCCs could explain this discrepancy in quantal size. To address this question we performed a comparative morphometric analysis of LDCV of electron microscopy (TEM) microphotographs taken from ultrathin sections of adrenal glands of embryos and their mothers.

A first visual inspection of the pictures revealed a marked dissimilarity in the pattern of LDCV distribution in the cytoplasm: In MCCs they appeared throughout the

whole cytosol, while in ECCs they were located closer to the plasma membrane (PM) often delineating a ring below it (Fig. 2A, B). Many MCCs showed a clear polarization, with the nucleus located at one end and the bulk of the LDCVs at the other (Fig. 2B) in agreement with previous ultrastructural reports (14). When LDCV section areas were measured, a variety of surface values was found, since the sections sliced the vesicles at random planes. In Fig. 2C and 2D, histograms of vesicle areas corresponding to the cell sections depicted above are shown. The histograms are skewed to the right with a greater skew for MCCs, suggesting more than one chromaffin granule size. The MCC histogram also had more LDCV areas with larger values to the right of the abscissa axis, which were absent in the ECCs, pointing to a larger mean vesicle area. Similar distributions were found in the majority of ECCs and MCCs; the latter tended to be more skewed to the right. We pooled together all the vesicles from 32 MCCs (9980 LDCVs) and 43 ECCs (1993 LDCVs) sections and plot a histogram of relative and cumulative size frequencies (Fig. 2E). The histograms were also right skewed with higher frequencies of appearance for smaller LDCVs sizes in ECCs and bigger sizes in MCCs. This is shown clearer in the cumulative frequency plots that reach the maximum value of 1 earlier in ECCs. The skewness coefficient values were 2.4 for ECCs and 9 for MCCs, indicating a greater spread to the right of the MCC LDCV sizes. We applied the Kolmogorov-Smirnov normality test and found that neither of the populations fit to a normal distribution. We further analyzed and statistically compared mean areas by finding the median of the LDCV areas of each cell section, pooling and comparing them with a non-parametric test. This analytical approach was taken in order not to give a greater weight to cell sections with more granules as described in methods. MCC LDCV area was 1.45 times larger. This difference was statistically significant ($P < 0.001$). If a spherical shape for LDCVs is assumed the radius of the vesicles can be calculated from the mean vesicle section area. MCC radius was 1.2 times larger. The calculated MCC volume was 1.73 times that of ECCs.

A morphometric analysis II. Developmental change in LDCV number and proximity to PM

A second observation to the TEM pictures is that the amount of granules is much larger in MCCs. It can be appreciated in the example histograms of Fig 2C,D, where bins of the MCC have much higher values than those of ECCs. Thus, the number of vesicles per cell section was some 6.5 times larger in MCCs (309.1 ± 24.4 vesicles/section) than in ECCs (47.8 ± 3.1 vesicles/section, Fig. 2G). We also computed the number of vesicles per μm^2 of cytoplasm. Cytoplasm area was calculated by subtracting from the area enclosed by the PM the areas of the nuclei and large organelle such as mitochondria, large fractions of ER or large endosomes and vacuoles. Thus, in MCC sections there were 4.67 ± 0.22 LDCV/ μm^2 of cytoplasm, that is 2.5 times that of ECC sections which was 1.84 ± 0.12 LDCV/ μm^2 (Fig 2G). This apparent discrepancy between number of LDCVs/cell section and LDCV/ μm^2 is due to mature chromaffin cells having a bigger surface.

The number of vesicles at four different distance ranges from the PM was counted. A fraction amounting to $26 \pm 2\%$ of ECC LDCVs was located at less than 100 nm from the PM versus only $3.3 \pm 0.5\%$ of MCC LDCVs. At 100-200 nm, there were $24 \pm 1.3\%$ of LDCVs in ECCs and $6 \pm 0.6\%$ in MCCs. At 200-300 nm from the PM, $13 \pm 0.8\%$ of ECC granules and $6 \pm 0.5\%$ of MCC granules were found. Finally, $36 \pm 2.5\%$ ECC LDCVs were at distances greater than 300 nm versus $85 \pm 1.4\%$ of MCCs LDCVs (Fig. 2H). As a summary, ECCs have a considerably lesser number of LDCVs but they are closer to the plasmalemma.

This analysis quantitatively grounds the hypothesis of a developmental formation of the different vesicle pools in chromaffin cells. A similar thing has been reported in other cell types such as in hippocampal synapses *in vitro* (39). These pools would contain sets of vesicles which are postulated to be in different ready states before undergoing exocytosis (53).

LDCV releasable pools in ECCs and MCCs

Once loaded with their release cargo, LDCVs approach the PM until they make contact with it; they are then said to be docked (41, 58). There they undergo several “priming” steps until they get ready for exocytosis forming the readily releasable pool (RRP) (41, 53). The size of this pool in chromaffin cells has been estimated with EM (43) as well as with functional experiments, mainly with patch-clamp and capacitance (29). With the following experiments we aimed at finding a possible developmental change in the size of these releasable pools.

To measure the RRP pool we utilized perforated-patch clamp and the recourse of a paired pulse protocol, which consists in applying two short depolarizing pulses a few tens or hundreds of milliseconds apart, and measuring the cell membrane capacitance changes (ΔC_m) thus produced as an estimate of exocytosis. The rationale behind this experiment was that a sufficiently strong first stimulus would cause the fusion of most or all the granules ready to release (ΔC_{m1}); hence, if a second stimulus were applied before the pool is replenished, the second secretory response (ΔC_{m2}) would show depression; at this stage the pool of vesicles would be virtually depleted and its size can be estimated from ΔC_{m1} and ΔC_{m2} (3, 25).

We decided to measure the size of both the RRP and also of the IRP, a small subset of vesicles of the RRP highly coupled to the stimulus, which is defined by a somewhat faster kinetics (28, 29, 45). In order for the first pulse to induce the emptying of as much of the releasable pool as possible we raised the bath Ca^{2+} concentration to 5 mM. We applied depolarizing pulses adjusting the potential so that I_{Ca} was similar for both pulses. The criteria for inclusion in the analysis were as follows: integrated Ca^{2+} current (Q_{Ca}) difference had to be less than 10% between depolarizations 1 and 2; and a clear ΔC_m depression, which we established as a ratio of ΔC_{m2} to ΔC_{m1} of less than 0.8, had to be shown. We only studied cells that showed ΔC_m .

For RRP we used 2 depolarizations of 100 ms separated by 100 ms. The

capacitance change associated with the size of this pool was between a minimum estimate of 74 ± 9.2 fF and an maximum of 140 ± 3.0 fF (B_{min} and B_{max} , see methods) in MCCs. In ECCs RRP size was between 41 ± 9.0 and 56 ± 12 fF (Fig. 3A,C). That is, the inferred RRP was between 1.8 and 2.5 times larger in MCC than in ECCs. Since ΔC_m is proportional to the membrane area incorporated to the PM due to vesicle fusion, the difference in LDCV size found in the ultrastructural analysis had to be taken into account. Thus the inferred vesicle pool size difference could be explained by the fusion of the same number of LDCVs with different areas. But in this case only a ratio of around 1.4 in RRP size should be expected. We conclude therefore that MCC RRP is larger than ECC's because it probably contains more LDCVs. If we take into account the difference in LDCV area ratio then MCC RRP was between 1.25 (B_{min}) and 1.75 (B_{max}) times ECC RRP.

The IRP was calculated by using 10 ms depolarizations separated by 100 ms. We found values for MCCs between 22 ± 2.1 (mean \pm S.E.) and 49 ± 6.3 fF (B_{min} and B_{max}) whereas in ECCs they were between 12 ± 2.1 and 16 ± 5.0 fF. When corrected for vesicle surface, MCC IRC was larger than ECC by a factor between 1.26 (B_{min}) to 2.1 (B_{max}).

Discussion

We extend here previous results that pointed to developmental changes in the mechanisms of exocytosis in chromaffin cells (23). We have aimed to find possible determinants of this changes trying to approach physiology by a) using hypoxia as a stimulus, and b) looking into the native tissue structure performing EM in ultrathin sections of adrenal glands. By correlating structural and functional analysis interesting features have emerged, namely an increase in LDCV area, the number of LDCVs, vesicle pools and quantal size with development. These changes have a deep effect in LDCV distribution within the cytoplasm and likely contribute to shape the disparate release kinetics found.

The secretory spikes triggered by hypoxia were similar to those produced by a mild small depolarization with $25K^+$. Spikes became faster and larger when a stronger depolarizing stimulus of $75K^+$ was used (tables 1 and 2). This suggests that ECCs already possess some kind of mechanism to regulate release, which would be differentially activated depending on the stimulus.

It is interesting that quantal size remains stable in ECCs, around 0.2 pC, across all stimuli applied ($25K^+$, $25K^+$ with BayK8644, $75K^+$ and hypoxia). In contrast, adult cells showed a wider range of secretory behaviors and a remarkable stimulus-dependent change in quantal size as compared to ECCs (23). In other systems developmental changes in quantal size have also been described (5, 32, 61). Our results suggest that chromaffin cells would undergo a similar increase in quantal size with maturation.

Such a change agrees well with the increment in vesicle volume we have calculated from our EM measurements. It is reasonable to think that granule volume should be proportional to LDCV catecholamine content, i.e. to quantal size (Qamp). We calculated a MCC to ECC LDCV volume ratio of 1.78. This agrees well with the ratio of 1.8 between MCC and ECC Qamp when cells were challenged with a moderate stimulus of $25K^+$ (23). On the other hand, with stronger stimuli the MCC to ECC Qamp ratio increased up to 2.9. It is possible that chromaffin cells develop mechanisms when maturing that are activated with stronger stimuli; this kind of stimulus may select larger vesicles to be released, or could produce the fusion of LDCV and posterior compound exocytosis (1, 7, 15, 26, 40). It is of note that the skewness of the ECC LDCV area histogram was less pronounced than that of adult cells; skewness coefficients were 2.4 and 9 respectively indicating a greater proportion of bigger LDCVs in MCCs. In this context, a possible interpretation could be that MCC LDCVs have bigger and more variable quantal sizes. In this regard, one study has suggested the possibility of more than one LDCV size in adult mouse chromaffin cells (27).

The developmental change in the number of LDCVs in chromaffin cells parallels

the process of synaptogenesis in other areas of the nervous system in which a gradual increase in the number of synaptic vesicles accompanies maturation. Thus has been described in central synapses in the visual cortex (6), the occipital cortex (21), the hippocampus (39) and the calyx of Held at the auditory brainstem (55); it also occurs in the periphery in the neuromuscular junction (46) and in chromaffin cells as we describe here. Furthermore, most LDCVs in ECCs are strategically placed close to the PM where they would be most readily available at this stage of development. Thus, more than 85% of MCCs LDCVs are at further than 300 nm from the PM. In contrast 63% of ECCs are closer than 300 nm. Lesser number of vesicles with smaller quantal size could explain why non-innervated ECCs could require those vesicles to be closer to exocytotic sites to secure a rapid response to adapt the organism to hypoxia stress during fetal and perinatal life.

Descriptions of the emergence and development of vesicle pools with cell maturation had been previously presented in other cell types (39). A similar process could likely occur in chromaffin cells considering the differences in vesicle distribution we observed between ECCs and MCCs. When corrected for vesicle size, we found that the RRP was between 1.25 and 1.75 times larger in adult chromaffin cells. IRP MCC to ECC ratio was likewise between 1.26 and 2.1 (Fig. 3). It is worth considering here the PM area changes and its relation to vesicle pools. We found a developmental increase in chromaffin cell area by two different techniques, direct measurement of cell area in the TEM sections, and indirectly through comparison of cell membrane capacitance with the patch clamp experiments. This change in size is in agreement with previous observations (13). MCC Cm, and therefore PM area, was some 1.8 times larger than ECC. Thus the ratio of the RRP size to the cell area would be similar in both cell types if we use Bmax as the pool size; if Bmin is used it would be somewhat smaller in ECCs. It follows that the size of the RRP grows proportionally to the plasmalemma area. In this regard, it has been suggested that chromaffin cells possess specialized release sites (16, 47). The nature of this presumed functional release units and

whether there is a change with size and age in their amount, in the number of vesicles, or in the type and number of VACCs associated to them, cannot be clarified with our data. This could be the case since a coupling of the fast LDCVs released from the IRP to Ca^{2+} entering through P/Q type VACCs have been described in adult mouse chromaffin cell (2). The developmental increase in RRP and IRP sizes shown here could be accounted for by postulating an increase in the number of vesicles per release site or an increase in the number of release sites.

Various molecular effectors of exocytosis have been studied with the aid of chromaffin cells of transgenic mice. Some of these mutations are lethal and thus only embryo or neonate animals can be studied. In these cases, it may be of interest to consider whether the effects are happening on a transient developmental feature perhaps by complementing the studies with some experiment in developed conditional transgenic mice or mature transfected cells.

In conclusion, these findings bring about novel insights into the development of chromaffin cell exocytosis showing that in ECCs the quantal release of catecholamines is shaped by various factors that considerably differ from mature cells. A thorough understanding of the physiology of the release of catecholamines at this stage of development can bring therapeutic implications for insufficiently understood perinatal pathologies, such as sudden infant death syndrome.

Acknowledgments

We thank Francisco Urbano and Covadonga Aguado of the EM unit from *Servicio Interdepartamental de Investigación* (SIDI-UAM), for their expert help in EM sample preparation and advice in EM imaging. We thank the continued support of Fundación Teófilo Hernando, Madrid, Spain.

Disclosures

There is no conflict of interest in this work.

Grants

This work was supported by the following grants to AGG: (1) *Plan Nacional de Investigación* SAF 2010-21795; (2) *Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad*, Spain [RENEVAS-RETICS-RD06/0026]; (3) *Agencia Laín Entralgo, Comunidad de Madrid*, Spain [NDG07/9]; (4) *Fundación C.I.E.N. ISCIII* (85016/019); (5) *Fundación Eugenio Rodríguez Pascual*, Madrid, Spain.

References

1. **Alvarez de Toledo G, Fernandez JM.** Compound versus multigranular exocytosis in peritoneal mast cells. *The Journal of general physiology* 95: 397–409, 1990.
2. **Alvarez YD, Ibañez LI, Uchitel OD, Marengo FD.** P/Q Ca²⁺ channels are functionally coupled to exocytosis of the immediately releasable pool in mouse chromaffin cells. *Cell calcium* 43: 155–64, 2008.
3. **Alvarez YD, Marengo FD.** The immediately releasable vesicle pool: highly coupled secretion in chromaffin and other neuroendocrine cells. *Journal of neurochemistry* 116: 155–63, 2011.
4. **Alés E, Tabares L, Poyato JM, Valero V, Lindau M, Alvarez de Toledo G.** High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nature cell biology* 1: 40–4, 1999.
5. **Bellingham MC, Lim R, Walmsley B.** Developmental changes in EPSC quantal size and quantal content at a central glutamatergic synapse in rat. *The Journal of physiology* 511 (Pt 3: 861–9, 1998)
6. **Blue ME, Parnavelas JG.** The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. II. Quantitative analysis. *Journal of neurocytology* 12: 697–712, 1983.
7. **Bokvist K, Holmqvist M, Gromada J, Rorsman P.** Compound exocytosis in voltage-clamped mouse pancreatic beta-cells revealed by carbon fibre amperometry. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 439: 634–45, 2000.
8. **Bournaud R, Hidalgo J, Yu H, Girard E, Shimahara T.** Catecholamine secretion from rat foetal adrenal chromaffin cells and hypoxia sensitivity. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 454: 83–92, 2007.
9. **Buttigieg J, Brown S, Holloway AC, Nurse CA.** Chronic Nicotine Blunts Hypoxic Sensitivity in Perinatal Rat Adrenal Chromaffin Cells via Upregulation of KATP Channels: Role of 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor and Hypoxia-Inducible

- Factor-2 . *Journal of Neuroscience* 29: 7137–7147, 2009.
10. **Buttigieg J, Brown S, Zhang M, Lowe M, Holloway AC, Nurse CA.** Chronic nicotine in utero selectively suppresses hypoxic sensitivity in neonatal rat adrenal chromaffin cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22: 1317–26, 2008.
 11. **Chow RH, Von Rüden L, Neher E.** Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* 356: 60–3, 1992.
 12. **Colliver TL, Hess EJ, Pothos EN, Sulzer D, Ewing AG.** Quantitative and statistical analysis of the shape of amperometric spikes recorded from two populations of cells. *Journal of neurochemistry* 74: 1086–97, 2000.
 13. **Coupland RE, Tomlinson A.** The development and maturation of adrenal medullary chromaffin cells of the rat in vivo: a descriptive and quantitative study. *International journal of developmental neuroscience.* 419–38, 1989.
 14. **Coupland RE.** Electron Microscopic Observations on the Structure of the Rat Adrenal Medulla. I. The Ultrastructure and Organization of Chromaffin Cells in the Normal Adrenal Medulla. *Journal of anatomy* 99: 231–54, 1965.
 15. **Creutz CE, Pollard HB.** Development of a cell-free model for compound exocytosis using components of the chromaffin cell. *Journal of the autonomic nervous system* 7: 13–8, 1983.
 16. **Cuchillo-Ibáñez I, Michelena P, Albillos A, García AG.** A preferential pole for exocytosis in cultured chromaffin cells revealed by confocal microscopy. *FEBS letters* 459: 22–6, 1999.
 17. **De Diego AMG, Arnáiz-Cot JJ, Hernández-Guijo JM, Gandía L, García AG.** Differential variations in Ca²⁺ entry, cytosolic Ca²⁺ and membrane capacitance upon steady or action potential depolarizing stimulation of bovine chromaffin cells. *Acta physiologica (Oxford, England)* 194: 97–109, 2008.
 18. **De Diego AMG, Fernández-Morales JC, Lorrio S, Diaz M, G. Garcia A.** L-type calcium channels dominate the quantal catecholamine release in embryo rat chromaffin cells stimulated with high K or hypoxia. In: *WorldPharma 2010*. Copenhagen. Denmark.: 2010, p. 140.
 19. **De Diego AMG, Fernández-Morales JC, Lorrio S, Diaz M, G. Garcia A.** Distinct role of T and L type channels in neonatal rat chromaffin cells. In: *The 16th International Symposium on Chromaffin Cell Biology*. Beijing. China.: 2011.
 20. **De Diego AMG, Gandía L, García AG.** A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta physiologica (Oxford, England)* 192: 287–301, 2008.
 21. **Dyson SE, Jones DG.** Quantitation of terminal parameters and their inter-relationships in maturing central synapses: a perspective for experimental studies. *Brain research* 183: 43–59, 1980.
 22. **Díaz E, Ayala G, Díaz ME, Gong L-W, Toomre D.** Automatic detection of large dense-core vesicles in secretory cells and statistical analysis of their intracellular distribution. *IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics*

/ IEEE, ACM 7: 2–11, 2010.

23. **Fernández-Morales JC, Cortés-Gil L, García AG, De Diego AMG.** Differences in the quantal release of catecholamines in chromaffin cells of rat embryos and their mothers. *Am j Physiol. Cell Physiol* 297: C407–18, 2009.
24. **García-Fernández M, Mejías R, López-Barneo J.** Developmental changes of chromaffin cell secretory response to hypoxia studied in thin adrenal slices. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 454: 93–100, 2007.
25. **Gillis KD, Mossner R, Neher E.** Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. *Neuron* 16: 1209–20, 1996.
26. **Glowatzki E, Fuchs PA.** Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nature neuroscience* 5: 147–54, 2002.
27. **Grabner CP, Price SD, Lysakowski A, Fox AP.** Mouse chromaffin cells have two populations of dense core vesicles. *Journal of neurophysiology* 94: 2093–104, 2005.
28. **Heinemann C, Von Rüden L, Chow RH, Neher E.** A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 424: 105–12, 1993.
29. **Horrigan FT, Bookman RJ.** Releasable pools and the kinetics of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Neuron* 13: 1119–29, 1994.
30. **Kawagoe KT, Zimmerman JB, Wightman RM.** Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *Journal of neuroscience methods* 48: 225–40, 1993.
31. **Keating DJ, Rychkov GY, Roberts ML.** Oxygen sensitivity in the sheep adrenal medulla: role of SK channels. *American journal of physiology. Cell physiology* 281: C1434–41, 2001.
32. **Kim G, Kandler K.** Synaptic changes underlying the strengthening of GABA/glycinergic connections in the developing lateral superior olive. *Neuroscience* 171: 924–33, 2010.
33. **Lagercrantz H, Bistoletti P.** Catecholamine release in the newborn infant at birth. *Pediatric research* 11: 889–93, 1977.
34. **Levitsky KL, López-Barneo J.** Developmental change of T-type Ca²⁺ channel expression and its role in rat chromaffin cell responsiveness to acute hypoxia. *The Journal of physiology* 587: 1917–29, 2009.
35. **Lindau M, Fernandez JM.** IgE-mediated degranulation of mast cells does not require opening of ion channels. *Nature* 319: 150–3, 1986.
36. **Lindau M, Neher E.** Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 411: 137–46, 1988.
37. **Mojet MH, Mills E, Duchen MR.** Hypoxia-induced catecholamine secretion in isolated newborn rat adrenal chromaffin cells is mimicked by inhibition of mitochondrial respiration. *The Journal of physiology* 504 (Pt 1: 175–89, 1997).

38. **Mosharov E V, Sulzer D.** Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nature methods* 2: 651–8, 2005.
39. **Mozhayeva MG, Sara Y, Liu X, Kavalali ET.** Development of vesicle pools during maturation of hippocampal synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 654–65, 2002.
40. **Neef A, Khimich D, Pirih P, Riedel D, Wolf F, Moser T.** Probing the mechanism of exocytosis at the hair cell ribbon synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 12933–44, 2007.
41. **Neher E.** Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20: 389–99, 1998.
42. **Orozco C, García-de-Diego AM, Arias E, Hernández-Guijo JM, García AG, Villarroya M, López MG.** Depolarization preconditioning produces cytoprotection against veratridine-induced chromaffin cell death. *European journal of pharmacology* 553: 28–38, 2006.
43. **Plattner H, Artalejo AR, Neher E.** Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *The Journal of cell biology* 139: 1709–17, 1997.
44. **Rae J, Cooper K, Gates P, Watsky M.** Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *Journal of neuroscience methods* 37: 15–26, 1991.
45. **Von Rüden L, Neher E.** A Ca-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Science* 262: 1061–5, 1993.
46. **Sanes JR, Lichtman JW.** Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annual review of neuroscience* 22: 389–442, 1999.
47. **Schroeder TJ, Jankowski JA, Senyshyn J, Holz RW, Wightman RM.** Zones of exocytotic release on bovine adrenal medullary cells in culture. *The Journal of biological chemistry* 269: 17215–20, 1994.
48. **Seidler FJ, Slotkin TA.** Adrenomedullary function in the neonatal rat: responses to acute hypoxia. *The Journal of physiology* 358: 1–16, 1985.
49. **Serra J.** *Image Analysis and Mathematical Morphology*. Academic Press, 1993.
50. **Slotkin TA, Seidler FJ.** Adrenomedullary catecholamine release in the fetus and newborn: secretory mechanisms and their role in stress and survival. *Journal of developmental physiology* 10: 1–16, 1988.
51. **Staal RGW, Mosharov E V, Sulzer D.** Dopamine neurons release transmitter via a flickering fusion pore. *Nature neuroscience* 7: 341–6, 2004.
52. **Sørensen JB, Nagy G, Varoqueaux F, Nehring RB, Brose N, Wilson MC, Neher E.** Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* 114: 75–86, 2003.
53. **Sørensen JB.** Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 448: 347–62, 2004.

54. **Taschenberger H, Von Gersdorff H.** Fine-tuning an auditory synapse for speed and fidelity: developmental changes in presynaptic waveform, EPSC kinetics, and synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20: 9162–73, 2000.
55. **Taschenberger H, Leão RM, Rowland KC, Spirou GA, Von Gersdorff H.** Optimizing synaptic architecture and efficiency for high-frequency transmission. *Neuron* 36: 1127–43, 2002.
56. **Thompson RJ, Buttigieg J, Zhang M, Nurse CA.** A rotenone-sensitive site and H₂O₂ are key components of hypoxia-sensing in neonatal rat adrenomedullary chromaffin cells. *Neuroscience* 145: 130–141, 2007.
57. **Thompson RJ, Nurse CA.** Anoxia differentially modulates multiple K⁺ currents and depolarizes neonatal rat adrenal chromaffin cells. *The Journal of physiology* 512 (Pt 2: 421–34, 1998).
58. **Verhage M, Sørensen JB.** Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic* 9: 1414–24, 2008.
59. **Voets T, Neher E, Moser T.** Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 23: 607–15, 1999.
60. **Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ, Viveros OH.** Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 10754–8, 1991.
61. **Yamashita T, Ishikawa T, Takahashi T.** Developmental increase in vesicular glutamate content does not cause saturation of AMPA receptors at the calyx of held synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23: 3633–8, 2003.

Figure Legends

Figure 1. Quantal secretory responses elicited by hypoxia or high K⁺. HIS was produced by 1 min perfusion of hypoxic solution. A typical recording is depicted in panel A, left. Inset: extended time scale of the marked areas of the same recording are shown in panel A, right. Notice the lack of overlapping spikes. High K⁺ secretion was elicited by 10-s perfusion of a solution containing either 25 mM K⁺ (25K⁺, panel B) or 75 mM K⁺ (75K⁺, panel C). The extended traces of 25K⁺ show some overlapping spikes while the 75K⁺ zoom show larger spikes (notice the amperometric current scale) and

abundance of overlaps. Example spikes without foot (panel D) and with foot (panel E) were selected from the secretory responses of panels A, B and C. Panel F shows the shape of averaged spikes generated by 75K⁺, 25K⁺ and hypoxia for this example.

Figure 2. Morphometric analysis of embryo and mother chromaffin cells from adrenal medulla sections. Panel A, microphotograph of an ECC adrenal section. Panel B, microphotograph of a MCC adrenal section. Notice the different distribution of large dense cored vesicles (LDCVs), which are outlined by a blue line, within the cytosol. Calibration bar, 1 μm . Vesicle area was also found by the automatic detection program. Panels C and D show histograms of the number of LDCV with different areas for the cells depicted in A and B, respectively; ECCs are represented by white bars and MCCs by grey bars. Scales are the same in both graphs to facilitate comparison. Notice the much smaller number of vesicles in almost all of the bins and the absence of large size vesicles to the right of the histogram of the ECC in panel C. Notice also that histograms are skewed to the right, likely indicating vesicles of several sizes. Panel E shows a frequency histogram for all the vesicles of all cells pooled together. Smaller sizes are abundantly represented in ECCs as compared to MCCs which show a more spread distribution; in this graph, thick lines represent cumulative frequencies. ECC bins and cumulative frequency line are colored black and MCCs' grey. The number of vesicles per cell section was also calculated (panel E, left axis) as well as the number of LDCV per μm^2 of cytoplasm area (panel E, right axis); cytoplasm area was calculated subtracting the area of the nucleus and other large organelle such as mitochondria, large endosomes or large portions of ER. LDCV number and density was larger with high statistical significance in MCCs. In panel F, percentage of vesicles within determined distances of plasma membrane was measured; the proportion of LDCVs close to the PM was clearly higher in ECCs. All differences are highly significant. *** $p < 0.001$ Mann-Whitney test; ER: Endoplasmic Reticulum; N: nucleus; M: mitochondria. Scale bar 1 μm .

Figure 3. Estimations of RRP and IRP sizes in ECCs and MCCs. Panel A shows

original Cm recordings of the 100-ms depolarization paired pulse protocol. Panel B shows original recordings of the 10-ms double pulse protocol. Notice the difference in scales between RRP and IRP capacitance traces. In both panels top recording was obtained from a MCC and bottom from an ECC. Pooled results of 11 MCCs and 10 ECCs used to compute the RRP are graphed in panel C. In order to calculate the IRP data shown in panel D, 9 MCCs and 7 ECCs were used. Both RRP and IRP are significantly larger in MCCs than in ECCs. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Mann-Whitney test.

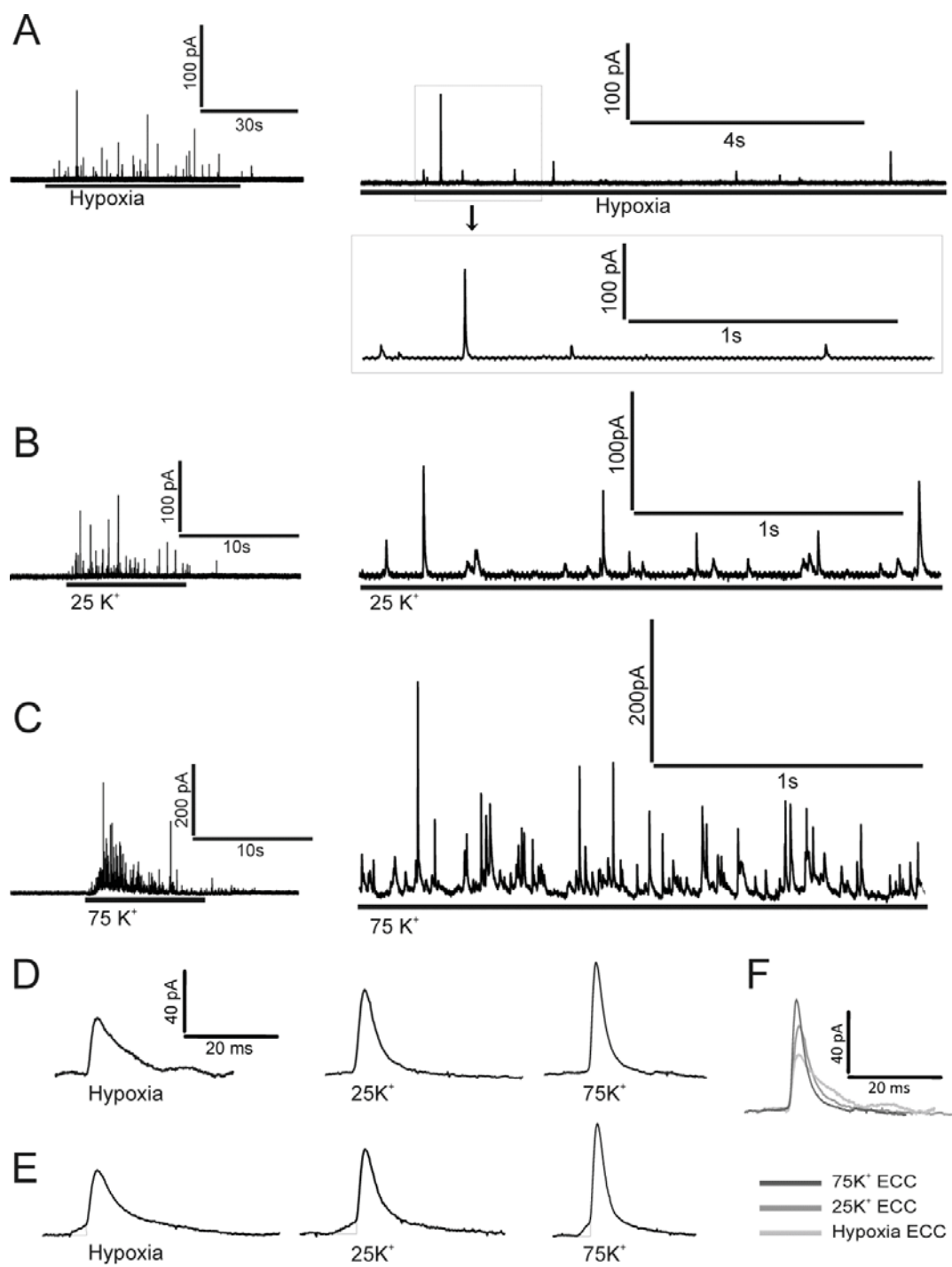


Figure 1

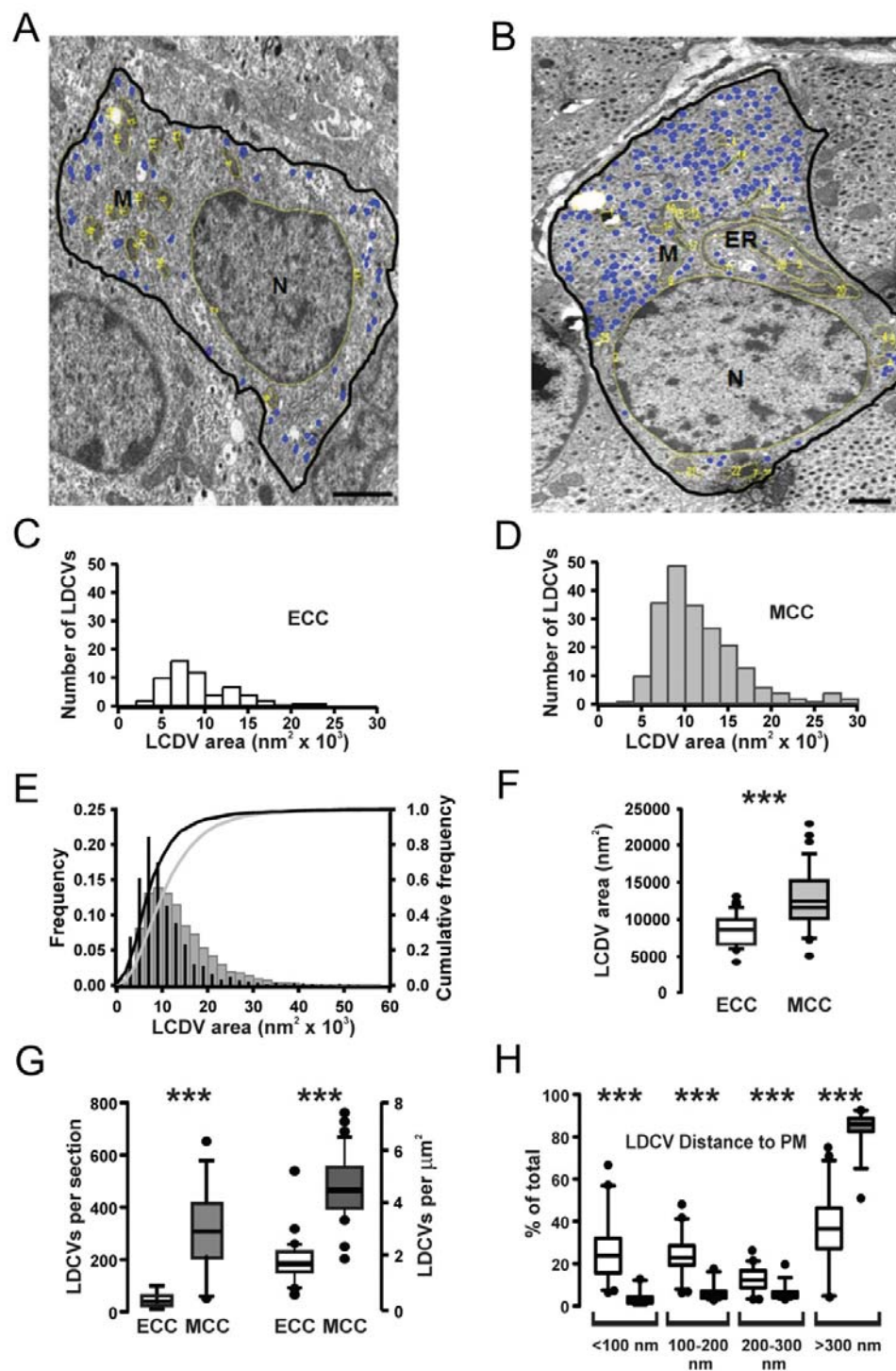


Figure 2

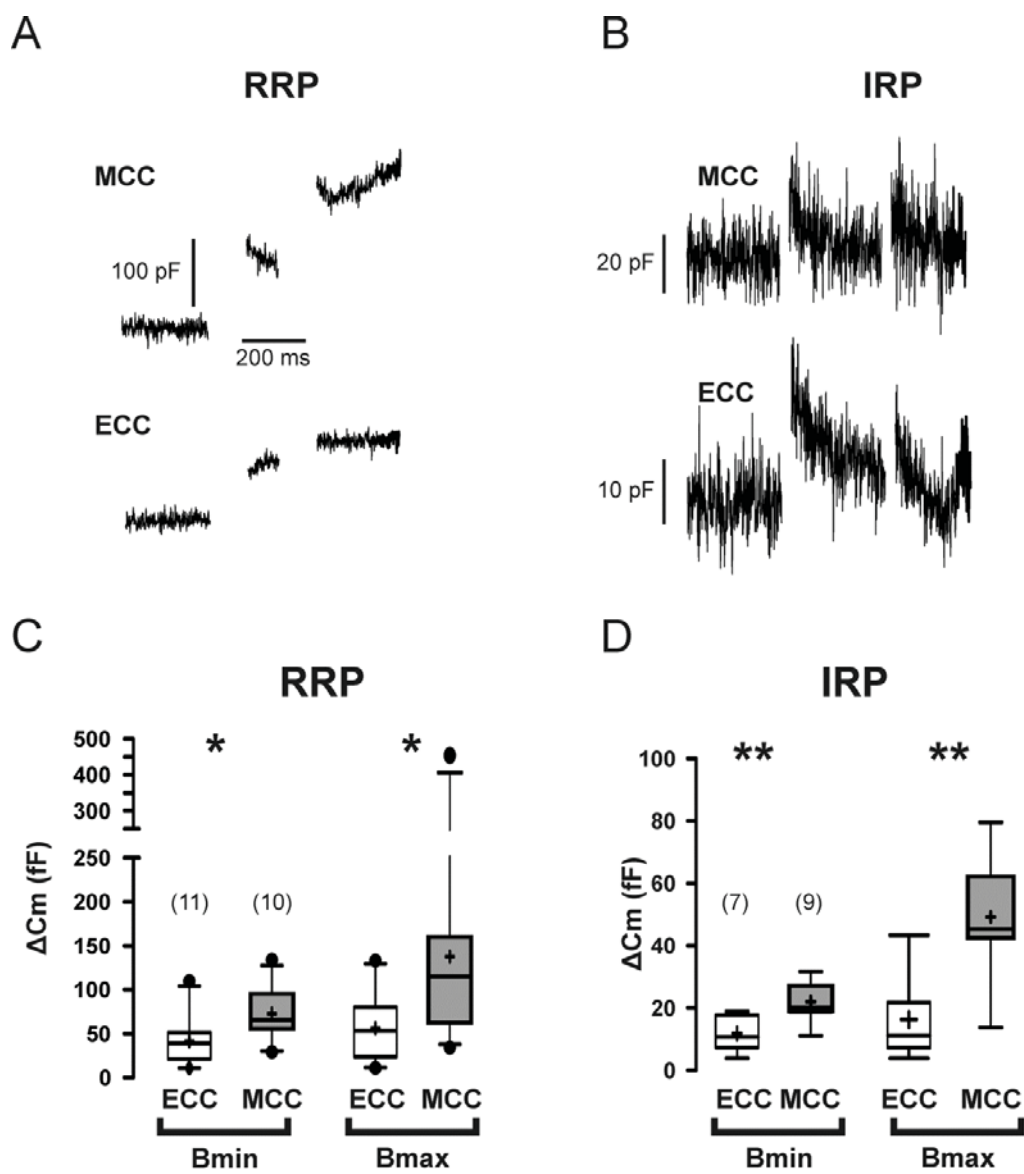


Table 1. Comparison of single-spike kinetic parameters calculated from burst secretory responses obtained in embryo chromaffin cells stimulated with K⁺ depolarizing pulses or hypoxia.

Stimulus	Events (cells)	Rise rate (pA/ms)	I _{max} (pA)	t _{1/2} (ms)	Q(pC)	Decay 75-25% (ms)	Reference
75K ⁺	1806 (45)	52.2 ± 4.8	45.8 ± 3.2	3.2 ± 0.2	0.18 ± 0.01	3.2 ± 0.3	Fernández-Morales et al., 2009
25K ⁺	491 (25)	26.1 ± 3.3**	34.3 ± 4.3*	4.8 ± 0.3***	0.19 ± 0.06	4.8 ± 0.4	Fernández-Morales et al., 2009
Hypoxia	780 (20)	23.4 ± 4 ***	29.3 ± 3**	5.8 ± 0.6***	0.2 ± 0.03	5.4 ± 0.7	This study

Events were selected from the burst secretory traces obtained upon challenging ECCs with 10-s K⁺ pulses (25 or 75 mM K⁺) or with 1-min hypoxia. Significant differences between 75K⁺ and the two other stimuli (25K⁺ and hypoxia) are symbolized with asterisks. Data are presented as mean ± SE. Statistical tests were performed using the mean of at least 15 spikes larger than 5 pA per individual cell for each parameter. The non-parametric Mann-Whitney rank sum test was used for comparison. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 with respect to 75K⁺ in each parameter.

Table 2. Kinetic parameters of spike feet calculated from secretory responses obtained in embryo chromaffin cells stimulated with K⁺ depolarizing pulses (25K⁺ and 75K⁺) or hypoxia.

Stimulus	Events (cells)	%Spikes with foot	I _{foot} (pA)	t _{foot} (ms)	Q _{foot} (pC)	Reference
75K ⁺	1806 (45)	42.9 ± 2.2	4.8 ± 0.34	3.4 ± 0.23	0.021±0.005	Fernández-Morales et al., 2009
25K ⁺	491 (25)	31.0±2.6***	4.2 ± 0.51	4.0 ± 0.55	0.025±0.007	Fernández-Morales et al., 2009
Hypoxia	780 (20)	28.4±3.6***	3.6 ± 0.26*	4.6 ± 0.54*	0.021±0.003	This study

Events were selected from the burst secretory traces obtained upon challenging ECCs with 10-s K⁺ pulses (25 or 75 mM K⁺) or with 1 min under hypoxia. Statistical differences between 75K⁺ and the two other stimuli (25K⁺ and hypoxia) are symbolized with asterisks. Data are presented as mean ± SE. Statistical tests were performed using the mean of at least 15 spikes per individual cell for each parameter. The non-parametric Mann-Whitney rank sum test was used for comparison. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 with respect to 75K⁺ in each parameter.

ARTÍCULO 5

**Crosstalk between T- and L-type Calcium Channels to
Regulate the Hypoxia-Induced Catecholamine Surge from
Rat Embryo Chromaffin Cells**

#José C. Fernández-Morales^{1,2}, #Juan-Fernando Padín^{1,2}, Marcos Maroto^{1,2}, Stefan Vestring¹, Enrique Calvo-Gallardo^{1,2}, Diego Castro Musial^{1,4}, Antonio G. García^{1,2,3}, Antonio M.G. de Diego^{1,2}.

¹Instituto Teófilo Hernando, ²Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain. ³Servicio de Farmacología Clínica, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario de la Princesa, UAM, Madrid, Spain. ⁴Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, Brazil

Equal contributors

Running head:

Ca²⁺ channels and hypoxia catecholamine release in fetal life

Contact information:

Antonio G. García

Instituto Teófilo Hernando

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Avda. Arzobispo Morcillo, 4

28029, Madrid (Spain)

Phone number: +34914973120/21

Fax number: +34914975380

e-mail: agg@uam.es

35 ABSTRACT

36 During fetal and perinatal life, hypoxia constitutes the main stimulus for the
 37 catecholamine surge necessary for embryo and neonate survival. Scarce
 38 pharmacological evidence suggests the involvement of Voltage Activated Ca^{2+}
 39 Channels (VACCs) of the T subtype (low-threshold, α_{1H} , Cav3.3) and the L subtype
 40 (high-threshold, α_{1D} , Cav1.3). The poor selectivity of T channel blockers limit their
 41 usefulness to clarify their role in cell types where both low- and high-VACCs are
 42 functionally expressed, as the case is for chromaffin cells (CCs). Here we found that the
 43 T channel blockers Ni^{2+} , mibefradil and NNC 55-0396 (NNC) caused a blockade of the
 44 whole-cell inward current carried by Ba^{2+} through high-VACCs (I_{Ba}) in voltage-
 45 clamped Bovine Chromaffin Cells (BCCs) and Rat Embryo Chromaffin Cells (RECCs),
 46 with IC_{50} s of, respectively, 70, 4.9 and 1.8 μM , and 41, 4.4 and 2.1 μM . Ni^{2+} , mibefradil
 47 and NNC also inhibited the K^{+} -elicited $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transients with IC_{50} s of, respectively, 9.5,
 48 0.09 and 1.15 μM in BCCs and 1.74, 1.49 and 6.9 μM in RECCs. At their IC_{20} and IC_{50}
 49 to block I_{Ba} , Ni^{2+} and mibefradil inhibited the HIS response by around 40 and 65 %, respectively,
 50 suggesting the likely implication of T as well as L channels in this effect.
 51 However, at its IC_{20} to block I_{Ba} , NNC inhibited the HIS response by 75%, suggesting
 52 the involvement of T channels. These results suggest that T and L channels may
 53 crosstalk to regulate such response as follows: the proven hypoxia-elicited mild
 54 depolarization recruits the T-type low-VACCs that contribute to augment membrane
 55 excitability and action potential firing; this will in turn recruit the L-type high-VACCs
 56 to augment Ca^{2+} entry and the HIS response.

57 KEYWORDS:

58 Embryo chromaffin cells, L channels, T channels, catecholamine release,
 59 calcium signalling, hypoxia.

60 **GLOSSARY:**

61 NNC: NNC 55-0396; VACCs: voltage activated Ca^{2+} channels; RECC: rat
62 embryo chromaffin cells; BCCs: bovine chromaffin cells; $[\text{Ca}^{2+}]_c$: cytosolic Ca^{2+}
63 concentration; Q_{amp} : cumulative amperometric charge; high-VACCs: high-voltage
64 activated Ca^{2+} channels; low-VACCs: low-voltage activated Ca^{2+} channels; HIS:
65 hypoxia-elicited secretion of catecholamines.

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83 INTRODUCTION

84 During fetal and perinatal life the immature non-innervated chromaffin cells
 85 (CCs) of the adrenal medullary gland behave as oxygen sensors. In doing so, they
 86 respond with a catecholamine surge to hypoxic stressful conflicts occurring during fetal
 87 life, at birth and during neonatal life. Those released catecholamines drive the
 88 cardiovascular, respiratory and metabolic changes required for survival and adaptation
 89 to the new environment at those early life stages (37, 38). The physiological and
 90 pathological relevance of this response is illustrated by one fact: the interference with
 91 this hypoxia-elicited catecholamine surge diminishes the potential for survival of the
 92 embryo and the newborn (25, 36, 38).

93 The study of the ionic mechanisms underlying the CC response to Hypoxia-
 94 Induced Secretion (HIS) has received much attention. However, we still have a partial
 95 knowledge on which ions are involved, their relative contribution and the way they
 96 crosstalk to regulate the HIS response. For instance, it is known that hypoxia inhibits
 97 Ca^{2+} - independent as well as Ca^{2+} -dependent K^+ channels (42). Additionally, small-
 98 conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channels have been proposed as oxygen sensors in fetal
 99 ovine CCs (24). Hypoxia also causes the activation of ATP-dependent K^+ channels (5,
 100 42) likely through inhibition of mitochondrial ATP synthesis and reduction of reactive
 101 oxygen species; this will modulate ion channels and hence membrane excitability (5,
 102 30, 40). This complex ion channel picture can be synthesized in the observation that
 103 hypoxia causes a mild depolarization of immature CCs, leading to an augmentation of
 104 the frequency of action potential firing by Embryo Chromaffin Cells (ECCs) (5, 42).
 105 This may lead to opening of Voltage-Activated Ca^{2+} Channels (VACCs), enhanced Ca^{2+}
 106 entry and the Ca^{2+} -dependent exocytotic HIS response; this is demonstrated by the fact
 107 that Cd^{2+} , a non-selective blocker of VACCs, inhibits such response (1, 17).

108 Mammalian CCs express functional high-VACCs of the L-subtype (α_{1D} ,
 109 Cav1.3), N-subtype (α_{1B} , Cav2.2) and PQ subtype (α_{1A} , Cav2.1) as well as low-VACCs
 110 of the T-subtype (α_{1H} , Cav3.2) (18, 29). The judicious use of ω -toxins and 1,4-
 111 dihydropyridine (DHP) derivatives has clarified the relative contribution of each VACC
 112 subtype to the catecholamine secretory responses triggered by depolarizing stimuli
 113 applied to CCs of adult mammals (18, 29).

114 In adult rat CCs, the whole-cell inward Ba^{2+} current through VACCs is carried
 115 50 % by L channels, 30 % by N channels, and 20 % by PQ channels; a T channel
 116 component is not visible (15). Upon stimulation with K^+ depolarizing pulses, adult rat
 117 CCs respond with quantal catecholamine responses that are triggered by the Ca^{2+}
 118 entering through L as well as PQ VACCs (13). Only after their exposure to chronic
 119 hypoxia, the adult rat chromaffin cell do express T channels; under this experimental
 120 condition, the stimulation of Ca^{2+} entry through these channels is capable of triggering
 121 the so-called low-threshold exocytosis (7).

122 Pharmacological dissection of I_{Ba} in Rat Embryo Chromaffin Cells (RECCs)
 123 also revealed the presence of functional L, N and PQ channels (de Diego et al., 2011) at
 124 relative densities similar to those we found in adult rat CCs (15). Furthermore, we found
 125 that the challenging of RECCs with a K^+ depolarizing pulse triggered a quantal
 126 catecholamine release response that was potentiated by L channel activator BayK8644
 127 and nearly fully suppressed by L channel blocker nimodipine; in contrast, ω -conotoxin
 128 MVIIC did not affect the response, suggesting that in RECCs, depolarization-elicited
 129 secretion is mostly controlled by L-type VACCs (13).

130 The relative contribution of high-VACCs and low-VACCs to exocytosis
 131 triggered by depolarization or hypoxic stimuli is an unresolved problem. Thus, in a

careful study it was found that only 50 % of RECCs were found to express functional T channels together with high-VACCs. However a train of depolarizing pulses causing substantial Ca^{2+} entry through T channels, did not evoke exocytosis; nevertheless, similar Ca^{2+} entry through high-VACCs produced a healthy exocytotic response (6). In contrast, a more recent study (27) shows that the HIS response in rat neonatal slices was suppressed by 25 μM Ni^{2+} , a concentration that selectively target T channels (8). Because this Ni^{2+} concentration did not affect the K^+ response, Levitsky and Lopez-Barneo (2009) explained this finding in the context of enhanced excitability of immature CCs expressing T channels as well as low-threshold exocytosis. It is unfortunate that these authors did not study the effects of nimodipine in their elegant study that as Ni^{2+} , should had fully blocked the HIS response, as there are major evidences suggesting its control by L-type VACCs, as nifedipine blocks this response in cultured neonate rat CCs (41), in neonatal adrenal slices (39) and in ovine fetal perfused adrenals (1).

To provide further insight into the relative contribution of L and T VACCs to the HIS response in RECCs, in the present study we have recourse to a well recognized selective blocker of L channels, nifedipine (18) and to the three more frequently used T channel blockers Ni^{2+} (8), mibefradil (11), and NNC 55-0396 (NNC) (23). It is accepted that the selectivity of T-channel blockers is limited and that at higher concentrations they also target the high-VACCs (10). To define their relative potencies to target the high-VACCs in CCs we first explored here their concentration-response effects on I_{Ba} and on the K^+ -elicited cytosolic Ca^{2+} transients ($[\text{Ca}^{2+}]_c$ in RECCs, that do express high-VACCs as well as low-VACCs, as discussed above. For comparative purposes we also tested the effects of Ni^{2+} , mibefradil and NNC on I_{Ba} and $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transients of adult Bovine Chromaffin Cells (BCCs) that do not express T channels (18). Then we studied

157 their effects on the HIS response of RECCs, at the concentrations IC_{20} and IC_{50} to block
 158 I_{Ba} . The results are compatible with the view that both T and L VACCs do contribute to
 159 such response; attempts are made to draw a picture on how the two channels crosstalk to
 160 regulate the safe-living catecholamine surge triggered by hypoxic stress occurring
 161 during fetal life, at birth and during perinatal life.

162 **MATERIALS AND METHODS**

163 *Ethical approval*

164 All experimental procedures with animals have been carried out in accordance
 165 with the Declaration of Helsinki and were performed following the rules approved by
 166 the Ethical Committee for the care and use of animals, of the Medical School,
 167 Autonomous University of Madrid, Spain, in accordance with the Directive 2010/63/EU
 168 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection
 169 of animals used for scientific purposes and with the Spanish Real Decreto of October 10
 170 2005 (RD 1201/2005). All efforts were made to minimize animal suffering.

171 *Culture of RECCs*

172 Chromaffin cells were obtained from 18-day-old (E18) rat embryos using a
 173 previously described protocol (13). Cells were seeded on poly-D-lysine-coated
 174 coverslips of one 12-well plates (for patch-clamp and secretion experiments) or on 6-
 175 well plates (for $[Ca^{2+}]_c$ monitoring). Experiments were carried out in cells that were
 176 kept in a water-saturated incubator at 37°C and a 5 % CO_2 atmosphere for 1 to 2 days.

177 *Culture of BCCs*

178 BCCs were isolated according to standard methods with some modifications
 179 (32). For patch-clamp studies and single-cell measurement of quantal catecholamine

180 release, cells were plated on 13-mm diameter glass coverslips at low density (1.0×10^5
 181 cells/coverslip). To study the changes of $[Ca]_c$, cells were plated at a density of 5×10^5
 182 cells/well in 25-mm six-well plates.

183 *Recording of I_{Ba}*

184 For patch-clamp recording of Ba^{2+} currents (I_{Ba}) the perforated-patch mode of
 185 the patch-clamp technique was used (22, 28), using amphotericin B as the permeating
 186 agent (2, 35). Tight seals ($>5 \text{ G}\Omega$) were achieved in a standard Tyrode solution
 187 composed of the following (in mM): 137 NaCl, 1 $MgCl_2$, 5 $BaCl_2$, 5.3 KCl, 10
 188 glucose, and 10 HEPES. I_{Ba} were recorded at room temperature (25 °C) using an EPC-
 189 10 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) patch-clamp amplifier controlled by
 190 PULSE software running on a personal computer. The access resistance was monitored
 191 until it decreased to $< 20 \text{ M}\Omega$. R_s averaged $8.6 \pm 0.3 \text{ M}\Omega$ in BCCs ($n = 82$) and
 192 $8.8 \pm 0.3 \text{ M}\Omega$ in RECCs ($n = 97$) and was always compensated by 95%. In all
 193 recordings, the holding potential was -80 mV . I_{Ba} was activated in response to 50-ms
 194 depolarizing voltage steps from -60 to $+60 \text{ mV}$ in 10-mV increments. Test voltage
 195 protocol was applied every 15 s. Current signals were filtered at 5 kHz, digitized at
 196 50 kHz, and on-line leak subtracted via a P/4 protocol.

197 *Measurements of changes of the cytosolic Ca^{2+} concentrations ($[Ca^{2+}]_c$)*

198 Chromaffin cells were incubated for 1 h at 37° C in DMEM containing the
 199 calcium probe Fura-2 AM (10 μM). After this incubation period, the coverslips were
 200 mounted in a chamber, and cells were washed and covered with Tyrode solution
 201 composed of (mM) 137 NaCl, 1 $MgCl_2$, 5.3 KCl, 2 $CaCl_2$, 10 HEPES, and 10 glucose,
 202 pH 7.3 with NaOH. The setup for single-cell fluorescence recordings and the
 203 experimental conditions were previously described (34). Fluorescence images were

204 generated at 1-s intervals. Images were digitally stored and analyzed using LAS AF
205 software (Leica; Barcelona, Spain).

206 *Amperometric recording of single-vesicle quantal catecholamine release*

207 Experimental conditions for cell stimulation and recording of single
208 amperometric spike events were as described (13, 45). The coverslips were mounted in
209 a chamber on a Nikon Diaphot inverted microscope (Nikon, Tokyo, Japan) used to
210 localize the target cell, which was continuously superfused by means of a five-way
211 superfusion system with a common outlet driven by electrically controlled valves, with
212 a Tyrode solution, as described above. The high K^+ solutions were prepared by
213 replacing equiosmolar concentrations of NaCl with KCl. At the time of experiment
214 performance, proper amounts of drug stock solutions were freshly dissolved into the
215 Tyrode solution.

216 For hypoxia experiments the reservoirs of the perfusion system were
217 continuously bubbled with either 95% air / 5 % CO_2 (normoxia) or 95 % N_2 / 5% CO_2
218 (hypoxia/anoxia) and were covered, except for a small hole where the needle carrying
219 the gas was introduced. A minimum of 30 min bubbling elapsed before the initiation of
220 the experiment, to allow time enough for cell equilibration with the solution. The
221 percentage of O_2 was measured using an Ecoscan Do 6 oximeter (Eutech Instruments,
222 Nijkerk, The Neatherlands). Within the reservoir, the solution reached complete anoxia;
223 in the perfusion system outlet, O_2 percentage oscillated between 5 and 10%. The
224 perfused solution replaced the surroundings of the cell by this strongly hypoxic
225 solution in less than 1 s.

226 *Chemical products*

Products to make saline solutions, barium chloride dihydrate, nickel chloride hexahydrate, NNC 55-0396 hydrate, mibefradil dihydrochloride hydrate and nifedipine were purchased to Sigma (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Tetrodotoxin citrate was from Ascent Scientific (Bristol, UK). The following chemicals were used for cell culture: DMEM and penicillin-streptomycin were from GIBCO (Scotland, UK), fetal bovine serum was from PAA laboratories (Pasching, Austria), and papain was from Worthington (Lakewood, NJ). The probe Fura-2AM was supplied by Invitrogen (Eugene, Oregon, USA). Stock solutions of Ni^{2+} , mibefradil and NNC were prepared in deionised water and nifedipine in DMSO at 10^{-2} M; solutions of nifedipine were prepared under sodium light and the experiments with this photosensitive dihydropyridine were performed also under sodium light.

Data analysis and statistics

I_{Ba} amplitude was measured at the maximum peak current during the 50-ms depolarizing pulse. Only the cells that held up the entire protocol (control, drug and wash) were included in the statistics. We used a Student's t test for comparison between control and drug I-V curves at each depolarizing voltage step. Data are represented as mean \pm S.E. of at least 3 different cultures. IC_{20} , IC_{50} and IC_{80} values for Ni^{2+} , mibefradil and NNC to block I_{Ba} were calculated by fitting the standardized data for current inhibition to the equation $\log(\text{antagonist})$ Vs. response

$$y = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / [1 + 10^{(X - \log \text{IC}_{50})}] \quad (1)$$

Where X is the logarithm of dose or concentration of compound, y is the response (normalized peak of I_{Ba}), decreasing as X increases; *top* and *bottom* are the plateaus in same units as X . IC_{20} , IC_{50} and IC_{80} values for Ni^{2+} , mibefradil and NNC were interpolated from standard curve with the confidence interval of the 95%. The

251 curve have a standard slope (Hill slope = -1.0). Statistical differences were defined by
252 * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$ with respect to control using the Mann-Whitney's rank-sum test.

253 Regarding cytosolic Ca^{2+} concentrations, data analysis was carried out on a
254 personal computer, and data obtained from LAS AF software, or Ascent software
255 version 2.4.2 were exported to Excel tables (Microsoft, Redmond, WA). Graphs and the
256 mathematical analyses were performed using the Graphpad Prism software, version
257 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Areas or peak heights were calculated
258 by integrating the Ca^{2+} transient over time during the stimulus duration by means of
259 Origin Pro 8 SR2 software, version 8.0891 (OriginLab Corporation, Northampton,
260 USA). IC_{50} values for the K^{+} -elicited $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transient blockade by Ni^{2+} , mibefradil and
261 NNC were calculated by using the equation (1), and were performed using Graphpad
262 Prism software, version 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Results
263 shown in the text and figures are expressed as mean \pm S.E. Unless otherwise stated,
264 statistical analyses were carried out with ANOVA one-way test, and Tukey post-hoc
265 analyses; *, **, or *** shows a statistical significance of $P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P <$
266 0.001, respectively.

267 For amperometric recordings, data analysis was carried out on a personal
268 computer using Excel (Microsoft, Redmond, WA) and IgorPro (Wavemetrics, Lake
269 Oswego OR). Amperometric charge (Q amp) was calculated by integrating the
270 amperometric current over time during the stimulus duration with a macro written in
271 IgorPro. The number of spikes greater than 5 pA was manually counted on an extended
272 graph displayed in the computer screen. A ruler was drawn at 5 pA, and only the spikes
273 going above the threshold amplitude were considered. Differences between means of
274 group data fitting a normal distribution were assessed by using either analysis of
275 variance or Kruskal-Wallis test for comparison among multiple groups or Student's t

test for comparison between two groups. $*P < 0.05$ was taken as the limit of significance.

RESULTS

Blockade by Ni^{2+} , mibefradil, and NNC of I_{Ba}

Ba^{2+} was used instead of Ca^{2+} as charge carrier to monitor the whole-cell inward currents through VACCs, because with Ca^{2+} the current was smaller than 100 pA in RECCs. This lower I_{Ca} could be explained by smaller surface area of RECCs (6.21 ± 0.17 pF, 82 cells) compared with BCCs (9.87 ± 0.31 pF, 115 cells). Mean peak I_{Ba} amplitude amounted to 440.4 ± 0.31 pA in 137 BCCs and to 253.1 ± 12.02 pA in 122 RECCs, consistent with the cell surface areas mentioned above for the two cell types. The relative density of high-VACCs was similar in both cell types i.e. 41 pA/pF in RECCs and 44 pA/pF in BCCs. A T-current component of I_{Ba} was observed in 17 % of RECCs. In BCCs this T component was not visible.

Fig. 1 shows the time-courses of I_{Ba} blockade elicited by 50 μM Ni^{2+} in BCCs (panel A) and RECCs (panel B). In both cases, the blockade developed fully in about 30 s and reached a steady-state at about half the initial I_{Ba} . The families of I_{Ba} traces obtained in a BCC (panel C) and a RECC (panel D) show the non-inactivating shape of such currents, the blockade elicited by 50 μM Ni^{2+} , and the rapid current recovery upon Ni^{2+} washout. I-V curves of pooled results are graphed in Fig.1E,F, respectively for BCCs and RECCs, showing the parallel reduction of the I-V curve in the presence of 50 μM Ni^{2+} and the full current recovery upon 5-min Ni^{2+} washout. Concentration-response curves show an IC_{50} for Ni^{2+} of 70 μM in BCCs (panel G) and 41 μM for RECCs (panel H). IC_{20} and IC_{80} values are shown in table 1. Of note is the voltage-dependence of Ni^{2+} -elicited blockade. For instance at -30 mV the blockade was 73 ± 18

300 % for BCCs and 65 ± 10 % for RECCs, using $50 \mu\text{M Ni}^{2+}$; however at -10 mV , the
 301 blockade amounted to only 33 ± 22.5 % for BCCs and 54 ± 11 % for RECCs.

302 As far as mibefradil was concerned, I_{Ba} blockade developed at a substantially
 303 lower rate. Thus, at $50 \mu\text{M}$ mibefradil elicited a gradual blockade that reached full
 304 completion in about 2 min in BCCs (Fig. 2A); $10 \mu\text{M}$ mibefradil caused 75 % of I_{Ba}
 305 blockade in RECCs, that also developed gradually (Fig. 2B). The recovery from
 306 blockade was also slow. Blockade of I_{Ba} elicited by mibefradil in RECCs (Fig. 2D,F)
 307 was quite similar to that produced in BCCs (Fig. 2C,E). Note the slow and partial
 308 reversibility of blockade that accounted for only 30 % of the fraction of I_{Ba} blocked by
 309 mibefradil in BCCs and to 50 % in RECCs. The IC_{50} for mibefradil blockade was quite
 310 close in BCCs ($4.95 \mu\text{M}$, Fig. 2G) and RECCs ($4.45 \mu\text{M}$, Fig. 2H). The values of IC_{20}
 311 and IC_{80} are shown in table 1.

312 NNC also caused a blockade of I_{Ba} that slowly developed to completion, as
 313 illustrated in the time-course curves performed on an example BCC (Fig. 3A) and
 314 RECC (Fig. 3B), with $50 \mu\text{M}$ of the compound. This slowness of blockade development
 315 did not seem to depend on NNC concentration since it was seen at this saturating
 316 concentration of the compound (25-fold higher than its IC_{50} , table 1). In 8 BCCs, $1 \mu\text{M}$
 317 NNC caused 41.8 ± 8.8 % blockade in 3 min and an almost full recovery from blockade
 318 after 5 min washout (97.8 ± 9.1 % of the initial I_{Ba}). At $5 \mu\text{M}$, NNC elicited 67.9 ± 8.2
 319 % blockade in 3 min in 6 BCCs; current recovery in 5 min amounted to only 64.7 ± 17.7
 320 % of the initial I_{Ba} . Qualitative similar results were obtained in RECCs. I_{Ba} traces and I-
 321 V curves before (control), during perfusion with $5 \mu\text{M}$ NNC in BCCs, and with $1 \mu\text{M}$
 322 NNC in RECCs and after 5 min washout. Threshold blockade began at -30 mV and
 323 caused no apparent shift of I-V curves. I_{Ba} peaked at 0 mV in BCCs (Fig. 3C,E) and at $-$
 324 10 mV in RECCs (Fig. 3D,F). Recovery of I_{Ba} after 5 min of $1 \mu\text{M}$ NNC washout was

complete. Concentration-response curves for NNC blockade of I_{Ba} are plotted in Fig. 3G,H. The IC_{50} for BCCs was $1.86 \pm 0.18 \mu M$ and for RECC $2.09 \pm 0.17 \mu M$. IC_{20} and IC_{80} values are given in table 1.

Blockade by nickel, mibefradil, and NNC of K^+ -elicited $[Ca^{2+}]_c$ transients

Fig. 4A shows the $[Ca^{2+}]_c$ responses elicited by the K^+ pulses (45 mM K^+ , low Na^+ , 5 s duration, given at 3-min intervals), their reduction by 100 μM Ni^{2+} and recovery upon Ni^{2+} washout, in an example BCC. Recovery was rapid but not complete. Normalized pooled data, in % of the initial responses within each individual cell, permitted the construction of the concentration-response curves displayed in Fig. 4B. After 1-4 min exposure to Ni^{2+} , the IC_{50} was 110 μM ; this was reduced to 20 μM after 7 min exposure to Ni^{2+} . Threshold 20 % blockade was achieved with 4 μM Ni^{2+} during 7-min perfusion. At 5 μM , Ni^{2+} showed a mild blocking effect that increased with time in an example RECC (Fig. 4C). A partial recovery was produced upon Ni^{2+} washout. The concentration-response curves exhibited little time-dependence for blockade development; furthermore, even 100 μM Ni^{2+} could not produce a blockade beyond 60 % (Fig. 4D). It could be that upon K^+ challenging for 5 s, the Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} Release (CICR) mechanism described to occur in chromaffin cells stimulated with K^+ (3), may partly account for the $[Ca^{2+}]_c$ elevation in RECCs. This could explain the partial blockade by Ni^{2+} of this K^+ response, that may have a substantial component linked to a well develop CICR mechanism in RECCs. With this partial blockade it was hard to estimate an accurate IC_{50} for Ni^{2+} .

Mibefradil caused a more drastic blockade of the $[Ca^{2+}]_c$ transients. For instance, in the example BCC shown in Fig. 5A, the transients were inhibited by 60 % with only 0.1 μM mibefradil. Time-dependence of blockade is clearly illustrated in the

concentration-response curves of Fig. 5B. So, after 1 min of perfusion with 10 μM mibefradil, only 40 % of the transient was inhibited. However, after 4 and 7 min the blockade augmented to 70 % and 80 %, respectively. At these times, the IC_{50} amounted to around 0.1 μM . As with Ni^{2+} , mibefradil seemed to exert a lesser potent blockade of the Ca^{2+} transients in RECCs. For example, in the cell shown in Fig. 5C, 6 μM mibefradil exhibited a clear time-dependent blockade. This is better seen with pooled results of the concentration-response curve of Fig. 5D. Thus, blockade at 100 μM was 40 % at 1 min of perfusion, 60 % at 4 min, and 65 % at 7 min. IC_{50} at 4-7 min perfusion was around 10 μM .

Finally, we also performed experiments with NNC that produced a drastic time-dependent near-full blockade of the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transients at the concentration of 10 μM (example BCC of Fig. 6A). At this concentration and upon 1-min perfusion, NNC only caused a 35 % blockade of the Ca^{2+} transients. However, after 4-min perfusion, the blockade augmented to 70 % and at 7 min it reached 85 % (Fig. 6B). IC_{50} at 4 and 7 min were 2 and 3 μM , respectively. Concerning RECCs the blockade was once more milder than that achieved in BCCs. For instance, in the example RECC shown in Fig. 6C, 10 μM NNC elicited a time-dependent blockade (15 % after 1 min perfusion, 45 % after 4 min and 65 % after 7 min). Of note is the slow and partial recovery of the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transient even after 6-9 min of NNC washout both in BCCs (Fig. 6A) and RECCs (Fig. 6C). The scarce blockade of the K^+ -elicited Ca^{2+} transient in RECCs (Fig. 6D) precluded the calculation of an IC_{50} . Only after 7 min of perfusion with NNC could an approximate IC_{50} of 10 μM be estimated. A summary of the IC_{50} s for the blockade of K^+ -elicited $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transients at 7 min perfusion of the blockers is presented in table 1 (parentheses). IC_{50} s to block the K^+ -elicited $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transients were smaller than those to block I_{Ba} , except for RECCs that was 3-fold higher in the case of NNC. An explanation

for this scarce correlation between the two measured parameters may be found in the fact I_{Ba} monitors calcium channel opening in 50 ms with no inactivation, while K^+ -elicited $[Ca^{2+}]_c$ transients are measured in the range of seconds, 1000-fold higher time range; under these last conditions, calcium- and voltage-dependent channel inactivation occurs (21, 44). In addition, in this seconds-time range mitochondria and the endoplasmic reticulum contribute markedly to the clearance of the $[Ca^{2+}]_c$ transient (3, 31).

Blockade by nickel, mibefradil and NNC of K^+ -elicited quantal catecholamine release

Single-vesicle quantal catecholamine release from single BCCs and RECCs, was amperometrically measured with protocols similar to those recently described (13, 14). A prototype spike burst is shown in Fig. 7A; this BCC constantly fired spikes along the entire K^+ pulse although at different rates. The secretory response per pulse was quantified in each individual cell by counting the number of spikes and the cumulative charge (Q_{amp}) obtained with the sum of all spikes, an indication of the total amount of catecholamine secreted per K^+ pulse. The values of P2 and P3 were normalized as % of P1 in each individual cell. Here, the concentrations of Ni^{2+} (50 μ M), mibefradil (5 μ M), and NNC (5 μ M) most widely used to target T-type channels, were chosen.

Fig. 7A shows near full blockade of spike response (P2) in an example BCC, during its perfusion with Ni^{2+} , and the practical full recovery after Ni^{2+} washout. A similar cell behavior was observed with mibefradil, that also recovered quite well after 10 min washout (Fig. 7B). The case was different for NNC that completely blocked the K^+ secretory response and did allow only a meager recovery after 5-10 min washout of the compound (Fig. 7C). Pooled results from 9 cells show 95 % blockade by Ni^{2+} of

398 both, amperometric spike number and Q_{amp} (Fig. 7D). In another 7 cells, mibefradil
 399 caused 85 % blockade of both parameters (Fig. 7E). Slightly smaller blockade, with
 400 partial recovery was achieved with NNC in 13 BCCs (Fig. 7F).

401 The behavior of the three blockers was similar in RECCs, although some
 402 differences were apparent. For instance, Ni^{2+} caused lesser blockade of the burst
 403 secretory spikes in the example RECC of Fig. 8A (P2) compared to that exerted on the
 404 BCC of Fig. 7A (P2). The same happened to be the case for mibefradil (compare, for
 405 instance, Figs. 8B and 7B). Only NNC seemed to cause a blockade of the RECC
 406 response as drastic as that observed in the BCC (compare Figs. 8C and 7C). Pooled
 407 results indicate that Ni^{2+} caused a 65 % blockade of spike number and Q_{amp} (Fig. 8D),
 408 mibefradil elicited 75 % blockade of Q_{amp} and 90 % blockade of spike number (Fig. 8E)
 409 and finally, NNC caused 80 % blockade of Q_{amp} and 95 % blockade of spike number
 410 (Fig. 8F). At 5-min washout, the recovery from blockade exerted by NNC (40 %) was
 411 smaller than that observed with mibefradil (80-90 %) and Ni^{2+} (75-80 %).

412 **Blockade by nickel, mibefradil, NNC, and nifedipine of hypoxia-elicited quantal** 413 **catecholamine release from rat embryo chromaffin cells**

414 Single-vesicle quantal catecholamine release elicited by subjecting RECCs to a
 415 1-min exposure to hypoxia was studied under control conditions and in the presence of
 416 Ni^{2+} , mibefradil, NNC, and nifedipine, using protocols similar to those used for $[Ca^{2+}]_c$
 417 monitoring. The HIS response consisted of individual spikes that were initiated after 2-
 418 5-s delay and that were present along the entire length of the hypoxic stimulus. Three
 419 sequential 1-min hypoxic stimuli given within the same cell at 5-min intervals (P1, P2
 420 and P3) produced similar HIS responses (Fig.9A). In 18 cells the P1 and P2 responses

were similar, but P3 was significantly decreased by $16 \pm 8 \%$ in the case of Q_{amp} and by $17 \pm 8 \%$ for spike number (Fig.9C).

Fig.9B shows the HIS responses of an example cell before (P1), during exposure to $25 \mu\text{M Ni}^{2+}$ (P2) and after Ni^{2+} washout (P3). In 12 cells subjected to this protocol, Ni^{2+} blocked Q_{amp} by $44 \pm 9.5 \%$ and spike number by $48 \pm 6.4 \%$; upon Ni^{2+} washout, the HIS responses (P3) recovered to near their initial values (Fig.9D).

In RECCs, hypoxia causes a mild membrane depolarization that gives rise to an augmentation of the rate of action potentials firing (5, 42) that may recruit all subtypes of VACCs. So, we thought of interest to explore the effects on the HIS response of selected concentrations of Ni^{2+} , mibefradil, and NNC that caused mild (IC_{20}) or intermediate blockade of I_{Ba} (IC_{50}). At $25 \mu\text{M}$ (twice its IC_{20} to block I_{Ba}), Ni^{2+} near halved the HIS response (Fig.9D). Thus we also tried at its higher IC_{50} concentration of $41 \mu\text{M}$ to block I_{Ba} in RECCs. Thus, at $41 \mu\text{M}$, Ni^{2+} depressed the HIS response by $60 \pm 4.9 \%$ and $56 \pm 7.6 \%$, respectively for Q and spike number (Fig.10A).

At its IC_{20} to block I_{Ba} ($0.9 \mu\text{M}$), mibefradil inhibited the HIS response by $35 \pm 6.7 \%$ (Q) and $37 \pm 6.2 \%$ (spike number) (Fig.10B). At its IC_{50} ($4.4 \mu\text{M}$), the blockade augmented to $71 \pm 4.3 \%$ (Q) and $67 \pm 4.8 \%$ (spike number) (Fig.10C). Finally, of note was the observation that at its IC_{20} to block I_{Ba} ($0.4 \mu\text{M}$), NNC caused as much as $73 \pm 5 \%$ blockade of Q_{amp} and 76 ± 1.7 blockade of spike number (Fig.10D).

The DHP derivative nifedipine has widely been used at $1\text{-}10 \mu\text{M}$ concentrations to selectively block the L-subtype (α_{1D} , Cav1.3) high-VACCs. In chromaffin cells, $1\text{-}3 \mu\text{M}$ nifedipine concentrations are employed to selectively target L-type channels (18). Here we used only $1 \mu\text{M}$ nifedipine to secure a highly selective blockade of only the L-subtype of VACCs of RECCs, to define its role in the triggering of the HIS response.

445 Fig. 11A shows an example cell subjected to the protocol consisting in three
446 sequential 1-min hypoxic stimuli given at 5-min intervals (P1, P2, P3); nifedipine, given
447 since 5 min before and during P2, nearly fully suppressed the HIS response that
448 completely recovered 5 min after drug washout. Fig.11B shows pooled results from 8
449 RECCs indicating an 85 ± 7.5 % blockade of the number of spikes of the P2 HIS
450 response. Total secretion (Q_{amp}) was also drastically blocked by 86 ± 5 % (Fig.11C).
451 Total recovery of the HIS response was observed at 5 min after drug washout.

452 DISCUSSION

453 In line with the general belief that reputed blockers of the T-subtype low-
454 VACCs also target high-VACCs (10, 18, 29), we have found here that Ni^{2+} , mibefradil
455 and NNC caused a full concentration-dependent blockade of CC I_{Ba} and hence, of the
456 three subtypes of high-VACCs expressed by BCCs and RECCs namely, L, N and PQ
457 (18). Of interest was the observation that the three compounds exhibited similar
458 potencies to block I_{Ba} in RECCs and BCCs (see their IC_{20} , IC_{50} and IC_{80} in table 1). An
459 obvious consequence of these effects was that the inhibition of I_{Ba} by Ni^{2+} , mibefradil
460 and NNC translated into a mitigation of the K^+ -elicited $[Ca^{2+}]_c$ transients that are greatly
461 shaped by Ca^{2+} entering through the VACCs, opened by membrane depolarization (12).
462 Although this might be true, incomplete blockade of the K^+ -elicited $[Ca^{2+}]_c$ transients
463 exerted by Ni^{2+} (Fig. 4), mibefradil (Fig. 5) and NNC (Fig. 6) contrasts with the full
464 concentration-dependent blockade of I_{Ba} produced by the three compounds (Figs. 1, 2
465 and 3). Differences in the blockade of the two parameters could be explained by the
466 milliseconds-time range used to monitor I_{Ba} and the second-time range used in the case
467 of K^+ -elicited $[Ca^{2+}]_c$ transients: while in the former the inactivation of VACCs is
468 unlikely, in the latter, the time and Ca^{2+} -dependent channel inactivation may occur (21,

469 44) as well as intracellular Ca^{2+} redistribution and its clearance by endoplasmic
 470 reticulum (3) and mitochondria (31).

471 An interesting feature of I_{Ba} blockade and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ transient blockade was its time
 472 dependence, that developed in few seconds for the organic cation Ni^{2+} but lasted a few
 473 minutes to reach equilibrium in the case of mibefradil and NNC; also the recovery from
 474 blockade of the two parameters was slow for mibefradil and NNC; in fact, it took tens
 475 of minutes for recovery of I_{Ba} and the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ transient after cell perfusion with NNC.
 476 This behavior reminds the slow time course of I_{Ba} blockade and its slow recovery,
 477 exerted by lipophilic compounds such as R56865 (16), dotarizine (43), and lubeluzole
 478 (20) in BCCs. The slow I_{Ba} blockade of mibefradil reminds that of dotarizine and the
 479 extremely slow blockade exerted by NNC reminds that of R56865 and lubeluzole. This
 480 gradual blockade could be linked to a time-dependent progressive accumulation of
 481 mibefradil and NNC at the plasmalemma of cell targets, as the case is for R56865,
 482 dotarizine and lubeluzole, as well as for another array of so-called wide-spectrum Ca^{2+} -
 483 channel blockers having a high octanol/water partition coefficient (26). The slow
 484 development of blockade of VACCs exerted by mibefradil and particularly the more
 485 potent NNC, should be carefully taken into consideration when using them as blockers
 486 of a particular $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ signal and its associated physiological function. In fact, their
 487 potencies to block such function may be considerably higher if the experimental design
 488 included a period of several minutes to allow the equilibration of mibefradil and NNC
 489 with the lipid environment of their target channels.

490 The quantal release of catecholamine triggered by a 75 mM K^{+} -based solution
 491 was near fully blocked by 50 μM Ni^{2+} , 5 μM mibefradil and 5 μM NNC in both BCCs
 492 (Fig. 7) and RECCs (Fig. 8). At this high concentration, K^{+} drives the membrane
 493 potential (E_{m}) from -60 mV to near 0 mV (33); at this strongly depolarized E_{m} , all

494 high-VACCs will be activated, as indicated by the peak I_{Ba} in Figs. 1, 2 and 3. The
 495 obvious conclusion, therefore, is that the 75 mM K^+ -elicited secretion is driven by high-
 496 VACCs and that its blockade by 50 μM Ni^{2+} , 5 μM mibefradil and 5 μM NNC, is due to
 497 inhibition of those channels. Therefore, we attempted to study the effects of lower
 498 concentrations of Ni^{2+} , mibefradil and NNC (i.e. around their IC_{20} and IC_{50}) to
 499 determine the extent of the HIS response blockade with scarcer I_{Ba} inhibition. In doing
 500 so, we aimed to define to what extent those compounds could block such response by
 501 their ability to block low-VACCs rather than high-VACCs.

502 Table 2 indicates that at 25 μM (twice its IC_{20} to block I_{Ba}), Ni^{2+} blocked the
 503 total HIS response (Q_{amp}) by 44 %; the blockade augmented to 60 % with 41 μM Ni^{2+} ,
 504 its IC_{50} to block I_{Ba} . Thus, it seems that blockade of the HIS response by Ni^{2+} , under the
 505 present experimental conditions, is associated to high-VACC blockade. Similar
 506 outcomes were obtained with mibefradil that at its IC_{20} to block I_{Ba} inhibited Q_{amp} by 35
 507 % and at its IC_{50} the blockade rose to 71 % (table 2). However, the case for NCC was
 508 quite different because at the low 0.4 μM concentration (its IC_{20} to block I_{Ba}) the
 509 blockade of the HIS response amounted to as much as 73 % (Q_{amp}) and 76 % (spike
 510 number) (table 2). NNC is reputed as having the highest potency of all available
 511 compounds to block T channels (23). Hence, it seems reasonable to conclude that the
 512 pronounced blockade of the HIS response elicited by the low 0.4 μM concentration is
 513 associated to blockade of T channels.

514 If both T and L channels contribute to the HIS response, the question arises to
 515 how they crosstalk to regulate such response. We will try to explain this crosstalk
 516 through the hypothesis summarized in the scheme of Fig. 12. As mentioned in the
 517 Introduction, hypoxia is known to inhibit various subtypes of K^+ channels (5, 24, 41,
 518 42), leading to mild depolarization of immature CCs (5, 42). Low-threshold VACCs of

the T subtype are known to open at mild membrane depolarisations (9) and to augment cell excitability in the sinus node of the heart right atrium (19) and in hippocampal neurons (4). Thus, we propose that T channel opening at the mild membrane depolarisations elicited by hypoxia, will enhance the RECC excitability thereby augmenting the firing of action potentials and the opening of high-threshold L-type VACCs. In contrast to T channels that have low-conductance for Ca^{2+} and inactivate quickly, L channels have a large Ca^{2+} conductance and they inactivate very slowly in CCs (21). We therefore favor the view that the large Ca^{2+} gradient through open L channels will efficiently trigger the HIS response. The modulation of L channel opening and of such response will be exerted by T channel opening through its ability to regulate cell excitability and the firing of action potentials at the mild depolarization levels elicited by hypoxia.

In conclusion, we have defined here the capacity of three reputed blockers of low-threshold T-subtype of VACCs, namely Ni^{2+} , mibefradil and NNC to also target the high-threshold VACCs in BCCs and RECCs, by monitoring the whole-cell I_{Ba} and the changes of K^+ elicited $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ transients. At the threshold concentration to block I_{Ba} , NNC caused a 70 % blockade of the HIS response of RECCs suggesting the involvement of T channels. Nifedipine practically abolished such response. Since both channels are regulating the HIS response, we suggest that T channels enhances RECC excitability to increase the firing of action potentials. In doing so, large-conductance L-subtype of VACCs open to provide the Ca^{2+} required to trigger the quantal release of catecholamines, necessary for survival during fetal life, at birth and during neonatal life.

543 **ACKNOWLEDGEMENTS**

544 We thank the continued support of Fundación Teófilo Hernando, Madrid, Spain.

545 **GRANTS:**

546 This work was supported by the following grants to AGG from Spanish Institutions: (1)
 547 SAF 2010-21795, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain; (2) RENEVAS-
 548 RETICS-RD06/0026, Instituto de Salud Carlos III, Spain; (3) CABYCIC (Cátedra
 549 Bioibérica / UAM for Inflammation and Cell Protection).

550 **AUTHOR CONTRIBUTIONS:**

551 *Participated in research design:* Antonio G. García, Antonio M.G. de Diego,
 552 José C. Fernández-Morales, Juan Fernando Padín

553 *Conducted experiments:* José C. Fernández-Morales, Juan Fernando Padín,
 554 Stefan Vestring, Marcos Maroto, Enrique Calvo-Gallardo, Antonio M.G. de
 555 Diego, Diego Castro Musial

556 *Performed data analysis:* José C. Fernández-Morales, Juan Fernando Padín,
 557 Marcos Maroto, Stefan Vestring, Enrique Calvo-Gallardo, Diego Castro Musial

558 *Wrote or contributed to the writing of the manuscript:* Antonio G. García, José
 559 C. Fernández-Morales, Antonio M.G. de Diego

560

561

562

563

564

565

566

567

568 **REFERENCES**

- 569 1. **Adams MB, Simonetta G, and McMillen IC.** The non-neurogenic
570 catecholamine response of the fetal adrenal to hypoxia is dependent on activation of
571 voltage sensitive Ca^{2+} channels. *Brain Res Dev Brain Res* 94: 182-189, 1996.

- 572 2. **Aggett PJ, Fenwick PK, and Kirk H.** The effect of amphotericin B on the
573 permeability of lipid bilayers to divalent trace metals. *Biochim Biophys Acta* 684: 291-
574 294, 1982.

- 575 3. **Alonso MT, Barrero MJ, Michelena P, Carnicero E, Cuchillo I, Garcia AG,**
576 **Garcia-Sancho J, Montero M, and Alvarez J.** Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in
577 chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol* 144: 241-
578 254, 1999.

- 579 4. **Becker AJ, Pitsch J, Sochivko D, Opitz T, Staniek M, Chen CC, Campbell**
580 **KP, Schoch S, Yaari Y, and Beck H.** Transcriptional upregulation of Cav3.2 mediates
581 epileptogenesis in the pilocarpine model of epilepsy. *J Neurosci* 28: 13341-13353,
582 2008.

- 583 5. **Bournaud R, Hidalgo J, Yu H, Girard E, and Shimahara T.** Catecholamine
584 secretion from rat foetal adrenal chromaffin cells and hypoxia sensitivity. *Pflugers Arch*
585 454: 83-92, 2007.

- 586 6. **Bournaud R, Hidalgo J, Yu H, Jaimovich E, and Shimahara T.** Low
587 threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. *J Physiol* 537: 35-
588 44, 2001.

- 589 7. **Carabelli V, Marcantoni A, Comunanza V, de Luca A, Diaz J, Borges R,**
590 **and Carbone E.** Chronic hypoxia up-regulates α_1H T-type channels and low-
591 threshold catecholamine secretion in rat chromaffin cells. *J Physiol* 584: 149-165, 2007.
- 592 8. **Carbone E, and Lux HD.** A low voltage-activated calcium conductance in
593 embryonic chick sensory neurons. *Biophys J* 46: 413-418, 1984.
- 594 9. **Carbone E, and Lux HD.** A low voltage-activated, fully inactivating Ca
595 channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310: 501-502, 1984.
- 596 10. **Catterall WA.** Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect*
597 *Biol* 3: a003947, 2012.
- 598 11. **Clozel JP, Ertel EA, and Ertel SI.** Discovery and main pharmacological
599 properties of mibefradil (Ro 40-5967), the first selective T-type calcium channel
600 blocker. *J Hypertens Suppl* 15: S17-25, 1997.
- 601 12. **Douglas WW, and Poisner AM.** Stimulation of uptake of calcium-45 in the
602 adrenal gland by acetylcholine. *Nature* 192: 1299, 1961.
- 603 13. **Fernandez-Morales JC, Cortes-Gil L, Garcia AG, and de Diego AM.**
604 Differences in the quantal release of catecholamines in chromaffin cells of rat embryos
605 and their mothers. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: C407-418, 2009.
- 606 14. **Fernandez-Morales JC, Yanez M, Orallo F, Cortes L, Gonzalez JC,**
607 **Hernandez-Guijo JM, Garcia AG, and de Diego AM.** Blockade by nanomolar
608 resveratrol of quantal catecholamine release in chromaffin cells. *Mol Pharmacol* 78:
609 734-744, 2010.

- 610 15. **Gandia L, Borges R, Albillos A, and Garcia AG.** Multiple calcium channel
611 subtypes in isolated rat chromaffin cells. *Pflugers Arch* 430: 55-63, 1995.
- 612 16. **Garcez-Do-Carmo L, Albillos A, Artalejo AR, de la Fuente MT, Lopez MG,**
613 **Gandia L, Michelena P, and Garcia AG.** R56865 inhibits catecholamine release from
614 bovine chromaffin cells by blocking calcium channels. *Br J Pharmacol* 110: 1149-1155,
615 1993.
- 616 17. **Garcia-Fernandez M, Mejias R, and Lopez-Barneo J.** Developmental
617 changes of chromaffin cell secretory response to hypoxia studied in thin adrenal slices.
618 *Pflugers Arch* 454: 93-100, 2007.
- 619 18. **Garcia AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L, Borges R, and Garcia-Sancho**
620 **J.** Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 86: 1093-
621 1131, 2006.
- 622 19. **Hagiwara N, Irisawa H, and Kameyama M.** Contribution of two types of
623 calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*
624 395: 233-253, 1988.
- 625 20. **Hernandez-Guijo JM, Gandia L, de Pascual R, and Garcia AG.** Differential
626 effects of the neuroprotectant lubeluzole on bovine and mouse chromaffin cell calcium
627 channel subtypes. *Br J Pharmacol* 122: 275-285, 1997.
- 628 21. **Hernandez-Guijo JM, Maneu-Flores VE, Ruiz-Nuno A, Villarroja M,**
629 **Garcia AG, and Gandia L.** Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca^{2+}
630 channels in chromaffin cells: role of mitochondria. *J Neurosci* 21: 2553-2560, 2001.
- 631 22. **Horn R, and Marty A.** Muscarinic activation of ionic currents measured by a
632 new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 92: 145-159, 1988.

- 633 23. **Huang L, Keyser BM, Tagmose TM, Hansen JB, Taylor JT, Zhuang H,**
 634 **Zhang M, Ragsdale DS, and Li M.** NNC 55-0396 [(1S,2S)-2-(2-(N-[(3-benzimidazol-
 635 2-yl)propyl]-N-methylamino)ethyl)-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl
 636 cyclopropanecarboxylate dihydrochloride]: a new selective inhibitor of T-type calcium
 637 channels. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 193-199, 2004.
- 638 24. **Keating DJ, Rychkov GY, and Roberts ML.** Oxygen sensitivity in the sheep
 639 adrenal medulla: role of SK channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1434-1441,
 640 2001.
- 641 25. **Lagercrantz H, and Bistoletti P.** Catecholamine release in the newborn infant
 642 at birth. *Pediatr Res* 11: 889-893, 1977.
- 643 26. **Lara B, Gandia L, Torres A, Olivares R, Martinez-Sierra R, Garcia AG,**
 644 **and Lopez MG.** 'Wide-spectrum Ca^{2+} channel antagonists': lipophilicity, inhibition, and
 645 recovery of secretion in chromaffin cells. *Eur J Pharmacol* 325: 109-119, 1997.
- 646 27. **Levitsky KL, and Lopez-Barneo J.** Developmental change of T-type Ca^{2+}
 647 channel expression and its role in rat chromaffin cell responsiveness to acute hypoxia. *J*
 648 *Physiol* 587: 1917-1929, 2009.
- 649 28. **Lindau M, and Fernandez JM.** A patch-clamp study of histamine-secreting
 650 cells. *J Gen Physiol* 88: 349-368, 1986.
- 651 29. **Mahapatra S, Calorio C, Vandael DH, Marcantoni A, Carabelli V, and**
 652 **Carbone E.** Calcium channel types contributing to chromaffin cell excitability,
 653 exocytosis and endocytosis. *Cell Calcium* 2012.

- 654 30. **Mojet MH, Mills E, and Duchen MR.** Hypoxia-induced catecholamine
655 secretion in isolated newborn rat adrenal chromaffin cells is mimicked by inhibition of
656 mitochondrial respiration. *J Physiol* 504 (Pt 1): 175-189, 1997.
- 657 31. **Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia**
658 **AG, Garcia-Sancho J, and Alvarez J.** Chromaffin-cell stimulation triggers fast
659 millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2: 57-
660 61, 2000.
- 661 32. **Moro MA, Lopez MG, Gandia L, Michelena P, and Garcia AG.** Separation
662 and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal
663 medullae. *Anal Biochem* 185: 243-248, 1990.
- 664 33. **Orozco C, Garcia-de-Diego AM, Arias E, Hernandez-Guijo JM, Garcia AG,**
665 **Villarroya M, and Lopez MG.** Depolarization preconditioning produces
666 cytoprotection against veratridine-induced chromaffin cell death. *Eur J Pharmacol* 553:
667 28-38, 2006.
- 668 34. **Padin JF, de Diego AM, Fernandez-Morales JC, Merino C, Maroto M,**
669 **Calvo-Gallardo E, Arranz JA, Yanez M, and Garcia AG.** Resveratrol augments
670 nitric oxide generation and causes store calcium release in chromaffin cells. *Eur J*
671 *Pharmacol* 2012.
- 672 35. **Rae J, Cooper K, Gates P, and Watsky M.** Low access resistance perforated
673 patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods* 37: 15-26, 1991.
- 674 36. **Seidler FJ, and Slotkin TA.** Adrenomedullary function in the neonatal rat:
675 responses to acute hypoxia. *J Physiol* 358: 1-16, 1985.

- 676 37. **Seidler FJ, and Slotkin TA.** Non-neurogenic adrenal catecholamine release in
677 the neonatal rat: exocytosis or diffusion? *Brain Res* 393: 274-277, 1986.
- 678 38. **Slotkin TA, and Seidler FJ.** Adrenomedullary catecholamine release in the
679 fetus and newborn: secretory mechanisms and their role in stress and survival. *J Dev*
680 *Physiol* 10: 1-16, 1988.
- 681 39. **Takeuchi Y, Mochizuki-Oda N, Yamada H, Kurokawa K, and Watanabe Y.**
682 Nonneurogenic hypoxia sensitivity in rat adrenal slices. *Biochem Biophys Res Commun*
683 289: 51-56, 2001.
- 684 40. **Thompson RJ, Buttigieg J, Zhang M, and Nurse CA.** A rotenone-sensitive
685 site and H₂O₂ are key components of hypoxia-sensing in neonatal rat adrenomedullary
686 chromaffin cells. *Neuroscience* 145: 130-141, 2007.
- 687 41. **Thompson RJ, Jackson A, and Nurse CA.** Developmental loss of hypoxic
688 chemosensitivity in rat adrenomedullary chromaffin cells. *J Physiol* 498 (Pt 2): 503-
689 510, 1997.
- 690 42. **Thompson RJ, and Nurse CA.** Anoxia differentially modulates multiple K⁺
691 currents and depolarizes neonatal rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 512 (Pt 2):
692 421-434, 1998.
- 693 43. **Villarroya M, Gandia L, Lara B, Albillos A, Lopez MG, and Garcia AG.**
694 Dotarizine versus flunarizine as calcium antagonists in chromaffin cells. *Br J*
695 *Pharmacol* 114: 369-376, 1995.
- 696 44. **Villarroya M, Olivares R, Ruiz A, Cano-Abad MF, de Pascual R, Lomax**
697 **RB, Lopez MG, Mayorgas I, Gandia L, and Garcia AG.** Voltage inactivation of Ca²⁺

entry and secretion associated with N- and P/Q-type but not L-type Ca^{2+} channels of bovine chromaffin cells. *J Physiol* 516 (Pt 2): 421-432, 1999.

45. **Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ, Jr., and Viveros OH.** Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10754-10758, 1991.

PERSONAL COMMUNICATIONS

1. **de Diego AM, Fernandez-Morales JC, Lorrio S, Díaz E, G. García A.** Distinct role of T and L-type channels in neonatal rat chromaffin cells. *The 16th International Symposium on Chromaffin Cell Biology* (ISCCB16). Peking University, Beijing, China. MSII, 2011.

727 **FIGURE CAPTIONS**

728

729 **Figure 1: Inhibition by nickel of barium currents.** Cells were continuously perfused
 730 with an extracellular solution containing 5 mM Ba^{2+} ; whole-cell inward barium currents
 731 were recorded under the perforated-patch mode of the patch-clamp technique, at a
 732 holding potential of -80 mV. Test-pulses to various voltages had a duration of 50 ms
 733 and were given at 15-s intervals. At 50 μM , Ni^{2+} caused a rapid I_{Ba} blockade (15 s) with
 734 a quick recovery upon its washout both, in a bovine chromaffin cell (BCC, panel A) and
 735 in a rat embryo chromaffin cell (RECC, panel B). The families of I_{Ba} traces before,
 736 during and after Ni^{2+} washout (panels C and D respectively for BCCs and RECCs)
 737 served to construct the I-V curves of panels E and F. Panels G and H represent the
 738 concentration-response curves for I_{Ba} blockade of Ni^{2+} , expressed in normalised values
 739 of peak currents, obtained at -10 mV. Data are means \pm S.E. of the number of cells
 740 shown in parentheses, from at least 3 different cell cultures. * $P < 0.05$ with respect to
 741 Control (Mann-Whitney's rank-sum test).

742

743 **Figure 2: Inhibition by mibefradil of barium currents.** Experimental recording
 744 conditions were as in Fig.1. At 50 μM , mibefradil caused an I_{Ba} blockade that developed
 745 quite slowly; in the BCC of panel A, full blockade was achieved after 2.5 min of
 746 pulsing while in the RECC of panel B, 70% blockade was achieved after 2 min
 747 perfusion of 10 μM mibefradil (note that in this cell, steady-state for mibefradil
 748 blockade was not achieved). Of note is the partial and slow current recovery even after
 749 5-10 min of mibefradil washout. The families of curves in panel C and D were obtained
 750 in example cells, before, 5 min after mibefradil and 5 min after its washout (a, b and c in
 751 panels C and D, respectively for a BCC and a RECC). Pooled results of I-V curves are
 752 shown in panels E and F. Normalised data on peak I_{Ba} in the presence of increasing

concentrations of mibefradil, after 5 min perfusion, are shown in panels G (BCCs) and H (RECCs). They are means \pm S.E. of the number of cells shown in parentheses from at least 3 different cultures. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared with respect to Control (Mann-Whitney's rank-sum test).

757

Fig. 3: Inhibition by NNC 55-0396 of barium currents. The experimental conditions to record I_{Ba} were as in Fig. 1. At 50 μ M, NNC elicited a gradual blockade of peak I_{Ba} that after 3.5 min of test pulse application (at -10 mV), reached full current inhibition in both, the BCC of panel A and the RECC of panel B. Note the slow and meager recovery of I_{Ba} after NNC washout. The families of I_{Ba} traces obtained from a BCC (C, a, b, c) and RECC (D, a, b, c) were obtained upon application of I-V protocols before (control), after 5 min perfusion and after 5 min washout of NNC. Pooled results of I-V curves are shown in panels E (BCCs) and F (RECCs). Note full I_{Ba} recovery here with 1 μ M NNC, compared with little recovery in panels A and B where 50 μ M NNC was used. Concentration-response curves for I_{Ba} blockade by NNC were graphed in panels G (BCCs) and H (RECCs). Data in panels E to H are means \pm S.E. of the number of cells shown in parentheses from at least 3 different cultures. * $P < 0.05$ compared with respect to Control (Mann-Whitney's rank-sum test).

771

Fig. 4: Inhibition by nickel (Ni^{2+}) of the K^+ - elicited elevations of $[Ca^{2+}]_c$. Fura-2-loaded cells were challenged with sequential 5-s duration depolarising pulses applied with a high- K^+ based solution (45 mM K^+ with isoosmotic NaCl reduction, 2 mM Ca^{2+}) at 3-min intervals (dots at the bottom of each original trace in panels A and B). The 2 initial control $[Ca^{2+}]_c$ transients elicited by K^+ pulses (control) were followed by another three K^+ pulses given in the presence of Ni^{2+} (top horizontal bar) and another 3

778 additional pulses applied after Ni^{2+} washout. A, trace obtained from an example bovine
 779 chromaffin cell (BCC); C, trace obtained from a rat embryo chromaffin cell (RECC).
 780 Concentration-response curves after 1, 4 or 7 min of cell perfusion with Ni^{2+} , are
 781 shown in panels B (BCCs) and D (RECCs). To obtain these curves, the amplitudes of
 782 the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transients, elicited by K^+ pulsing were normalised as % of the initial pre- Ni^{2+}
 783 K^+ -pulse in each individual cell (ordinate). Each cell was challenged with a single Ni^{2+}
 784 concentration. Data in panels B and D are means \pm S.E. of the number of cells given in
 785 parentheses, from at least 3 different cultures. Calculated IC_{50} are shown in table 2.

786

787 **Fig. 5: Inhibition by mibefradil of the K^+ - elicited elevations of $[\text{Ca}^{2+}]_c$.** Protocol
 788 was as in Fig. 4. The 2 initial control $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transients elicited by K^+ pulses (control)
 789 were followed by another three K^+ pulses given after 1, 4 and 7 min of perfusion with
 790 mibefradil, and another three additional pulses applied after mibefradil washout. A,
 791 trace obtained from an example bovine chromaffin cell (BCC); C, trace obtained from a
 792 rat embryo chromaffin cell (RECC). Concentration-response curves after 1, 4 and 7 min
 793 of cell perfusion with mibefradil, are shown in panels B (BCCs) and D (RECCs). To
 794 obtain these curves, the amplitudes of the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transients, elicited by K^+ pulsing, were
 795 normalised as % of the initial pre-mibefradil K^+ pulse in each individual cell (ordinate).
 796 Each cell was challenged with a single mibefradil concentration. Data in panels B and D
 797 are means \pm S.E. of the number of cells given in parentheses, from at least 3 different
 798 cultures. Calculated IC_{50} are shown in table 2.

799

800 **Fig. 6: Inhibition by NNC 55-0396 of the K^+ - elicited elevations of $[\text{Ca}^{2+}]_c$.** Protocol
 801 was as in Fig. 4. The 2 initial control $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transients elicited by K^+ pulses (control)
 802 were followed by another 3 K^+ pulses applied after 1, 4 and 7 min of perfusion with

803 mibefradil, and another 3 additional pulses applied after mibefradil washout. A, trace
 804 obtained from an example bovine chromaffin cell (BCC); C, trace obtained from a rat
 805 embryo chromaffin cell (RECC). Concentration-response curves after 1, 4 and 7 min of
 806 cell perfusion with NNC 55-0396, are shown in panels B (BCCs) and D (RECCs). To
 807 obtain these curves, the amplitudes of the $[Ca^{2+}]_c$ transients, elicited by K^+ pulsing,
 808 were normalised as % of the initial pre-NNC 55-0396 K^+ pulse in each individual cell
 809 (ordinate). Each cell was challenged with a single NNC 55-0396 concentration. Data in
 810 panels B and D are means \pm S.E. of the number of cells shown in parentheses, from at
 811 least 3 different cultures. Calculated IC_{50} are shown in table 2.

812

813 **Fig. 7: Inhibition by nickel, mibefradil and NNC 55-0396 (NNC) of the quantal**
 814 **catecholamine release responses triggered by high K^+ in bovine chromaffin cells**
 815 **(BCCs).** Three-four depolarizing pulses with a solution containing 75 mM K^+ (low Na^+)
 816 were sequentially applied to the example cells of panels A, B and C (bottom horizontal
 817 bars below each trace, P1, P2 and P3). P1 was applied before exposure to the blocker,
 818 P2 after 30 s exposure (Ni^{2+}) or 5 min exposure (mibefradil, NNC), and P3/P4 after 5/10
 819 min of compound washout. Note the ready reversibility of Ni^{2+} and mibefradil and the
 820 partial, time-dependent reversibility of NNC. Pooled results from experiments done
 821 with the protocols of panels A, B and C are plotted in the graph columns of panels D, E
 822 and F, respectively for Ni^{2+} , mibefradil and NNC. Data are represented as means \pm S.E.
 823 of the number of cells shown in parentheses, from at least 3 different cultures. They
 824 were normalised as % of total catecholamine release (Q_{amp}) and spike number obtained
 825 in P1 and calculated in each individual cell. *** $P < 0.001$, ### $P < 0.001$ with respect to P1
 826 (Mann-Whitney's rank-sum test).

827

828 **Fig. 8: Inhibition by nickel, mibefradil and NNC 55-0396 (NNC) of the quantal**
 829 **catecholamine release responses triggered by high K^+ in rat embryo chromaffin**
 830 **cells (RECCs).** Three-four depolarising pulses of a solution containing 75 mM K^+ (low
 831 Na^+) were sequentially applied to the example cells of panels A, B and C (bottom
 832 horizontal bars below each trace, P1, P2 and P3). P1 was applied before exposure to the
 833 blocker, P2 after 30 s (Ni^{2+}) or 5 min exposure (mibefradil, NNC) and P3/P4 after 5/10
 834 min of the compound washout. Note the ready reversibility of Ni^{2+} and mibefradil and
 835 the partial, time-dependent reversibility of NNC. Pooled results from experiments done
 836 with the protocols of panels A, B and C are plotted in the graph columns of panels D, E
 837 and F, respectively for Ni^{2+} , mibefradil and NNC. Data are means \pm S.E. of the number
 838 of cells shown in parentheses, from at least 3 different cultures. They were normalised
 839 as % of total catecholamine release (Q_{amp}) and spike number obtained in P1 and
 840 calculated in each individual cell. *** $P < 0.001$, ### $P < 0.001$ with respect to P1 (Mann-
 841 Whitney's rank-sum test).

842

843 **Fig. 9: Inhibition by nickel and NNC 55-0396 (NNC) of the quantal catecholamine**
 844 **release responses triggered by hypoxia in rat embryo chromaffin cells (RECCs).**
 845 Three 1-minute pulses with a hypoxic solution were sequentially applied to the example
 846 cells of panels A, B and C (bottom horizontal bars below each trace, P1, P2 and P3). In
 847 A, the cell was not exposed to blockers; in B and C, cells were exposed to Ni^{2+} or NNC
 848 for 30 s and 5 min before and during the hypoxia stimuli. The hypoxic P3 stimuli were
 849 applied 5 min after compound washout; recovery was complete in the case of Ni^{2+} and
 850 near complete in the case of NNC. Pooled data obtained from experiments done with
 851 the protocols of panels A, B and C are plotted in the graph columns of panels D, E and
 852 F, respectively for control cells and cells treated with Ni^{2+} or NNC. Data are means \pm

853 S.E. of the number of cells shown in parentheses, from at least 3 different cultures. They
 854 were normalised as % of total catecholamine release (Q_{amp} , left ordinate) or spike
 855 number (right ordinate), obtained in P1 and calculated in each individual cell. $*P<0.05$,
 856 $^{\#}P<0.05$, $***P<0.001$, $####P<0.001$ with respect to P1 (Mann-Whitney's rank-sum test).

857

858 **Fig. 10: Inhibition by the IC_{20} and IC_{50} concentrations to block I_{Ba} (see table 1) of**
 859 **Ni^{2+} , mibefradil and NNC (panel A to D), of the quantal catecholamine responses**
 860 **triggered by hypoxia in Rat Embryo Chromaffin Cells (RECCs).** Three 1-min
 861 pulses given with a hypoxic solution were sequentially applied to the selected cell in
 862 each experiment (P1, P2, P3). The cell was perfused with the indicated concentrations
 863 of each compound, since 30 s before (in the case of Ni^{2+}) or 5 min before (in the case of
 864 mibefradil and NNC) and during P2 (1 min hypoxia). The hypoxic P3 stimuli were
 865 applied 5 min after compound washout; recovery of the HIS response was near
 866 complete in the case of Ni^{2+} and NNC, and partial in the case of mibefradil. Data are
 867 means \pm S.E. of the number of cells and cultures shown in parentheses. They were
 868 normalized as % of total catecholamine release (Q_{amp} , left ordinate) or spike number
 869 (right ordinate), obtained in P1 and calculated in each individual cell. $*P<0.05$, $^{\#}P<0.05$,
 870 $***P<0.001$, $####P<0.001$ with respect to P1 (Mann-Whitney's rank-sum test).

871

872 **Fig. 11: Inhibition by nifedipine of the quantal catecholamine release responses**
 873 **triggered by hypoxia in Rat Embryo Chromaffin Cells (RECCs).** A, example cell
 874 subjected to three sequential 1-min pulses given with a hypoxic solution at 5-min
 875 intervals (P1, P2, P3). Five min before and during P2, the cell was perfused with
 876 nifedipine, as indicated by the bottom bar. The hypoxic P3 stimulus was applied 5 min
 877 after drug washout, indicating full recovery of the HIS response. Data in panels B (spike

number of the entire 1-min period of hypoxia) and C (integrated total quantal release, Q_{amp}) are means \pm S.E. of the number of cells and cultures shown in parentheses. They were normalized as % of the values obtained in P1, in each individual cell. * $P < 0.05$, # $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, ### $P < 0.001$ with respect to P1 (Mann-Whitney's rank-sum test).

882

Fig. 12: Illustration of our proposal on the crosstalk between T-type low-VACCs and L-type high-VACCs to regulate the hypoxia-elicited secretion of catecholamine (the HIS response) from RECCs. Hypoxia (1) produces the blockade of small and large conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channels (SK and BK) as well as of ATP-dependent K^+ channels (2), thereby causing a mild depolarization (3). Although small, this depolarization is sufficient to open the small conductance and rapid inactivating low-threshold T-type VACCs that will enhance membrane excitability and augment the firing rate of action potentials (4). At those larger depolarizations, the high-threshold L-subtype of VACCs will be recruited (5). Since these channels have large Ca^{2+} conductance and inactivate slowly, they drive sufficient Ca^{2+} from the outside of the cell to the inside, causing an elevation of the $[Ca^{2+}]_i$ (6) sufficient to trigger the quantal release of catecholamine, the HIS response (7).

895

896

897

898

899

900

901

902

903 **TABLES**

904 **Table 1:** Summary of the characteristics of the blockade by nickel, mibefradil and NNC
 905 55-0396 (NNC), of barium currents in BCCs and RECCs.

	Induction of blockade	Recovery from blockade	IC ₂₀ (μM)		IC ₅₀ (μM)		IC ₈₀ (μM)	
			BCCs	RECCs	BCCs	RECCs	BCCs	RECCs
Ni²⁺	Fast (seconds)	Fast (seconds)	19.3	11.7	70 (9.51)	41 (1.74)	340.4	214.2
Mibefradil	Slow (minutes)	Slow (minutes)	0.7	0.9	4.9 (0.09)	4.4 (1.49)	18.4	16.9
NNC	Slow (minutes)	Very slow (tens of minutes)	0.3	0.4	1.8 (1.15)	2.1 (6.89)	7	15.1

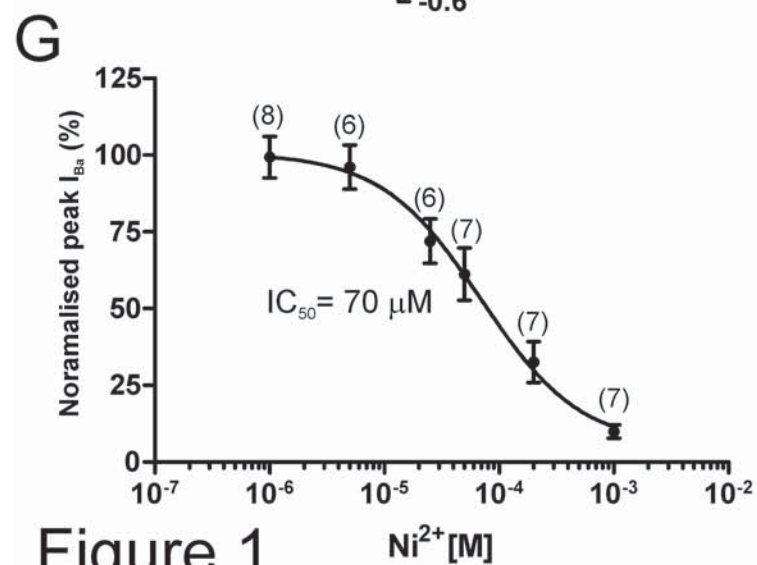
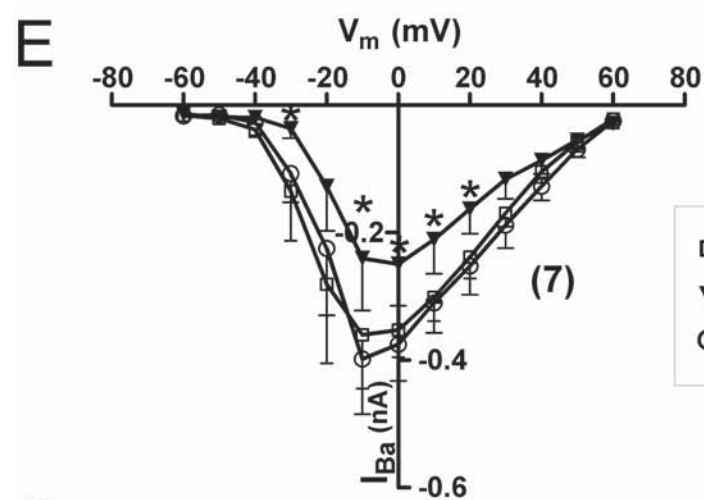
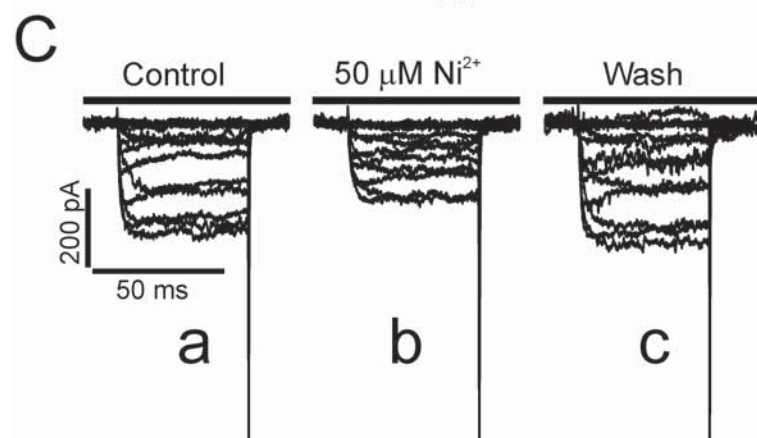
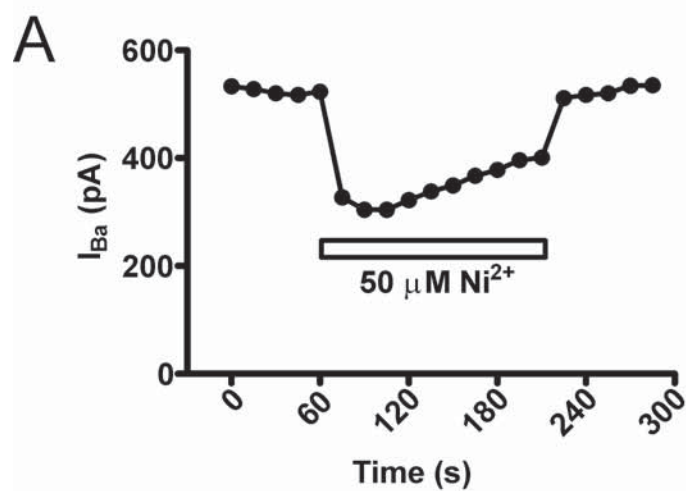
906 Data were calculated from the concentration-response curves graphed in Figs. 1, 2, and
 907 3. For comparative purposes the IC₅₀s for blockade of the K⁺-elicited [Ca²⁺]_c transients
 908 (calculated from data of Figs. 4,5 and 6) are given in parentheses.

909 **Table 2:** Relative blockade by Ni²⁺, mibefradil and NNC, of the HIS response of
 910 RECCs, exerted by a low concentration (close to the threshold concentration required to
 911 block I_{Ba} by 20 %) and at an intermediate concentration (IC₅₀ to block I_{Ba}).

Compound	Concentration (μM)	% blockade		
		Q _{amp}	Spike number	n, N
Ni²⁺	25 (2 x IC ₂₀ I _{Ba})	44 ± 9.5	48 ± 6.4	12, 3
	41 (IC ₅₀ I _{Ba})	60 ± 4.9	56 ± 7.6	8, 3
Mibefradil	0.9 (IC ₂₀ I _{Ba})	35 ± 6.7	37 ± 6.2	10, 3
	4.4 (IC ₅₀ I _{Ba})	71 ± 4.3	67 ± 4.8	7, 2
NNC	0.4 (IC ₂₀ I _{Ba})	73 ± 5	76 ± 1.7	13, 3
Nifedipine	1	86 ± 5	85 ± 7.5	8, 2

912 Data are means ± S.E. of the number of cells shown in n, from the number of different
 913 cell cultures indicated by N.

BCCs



RECCs

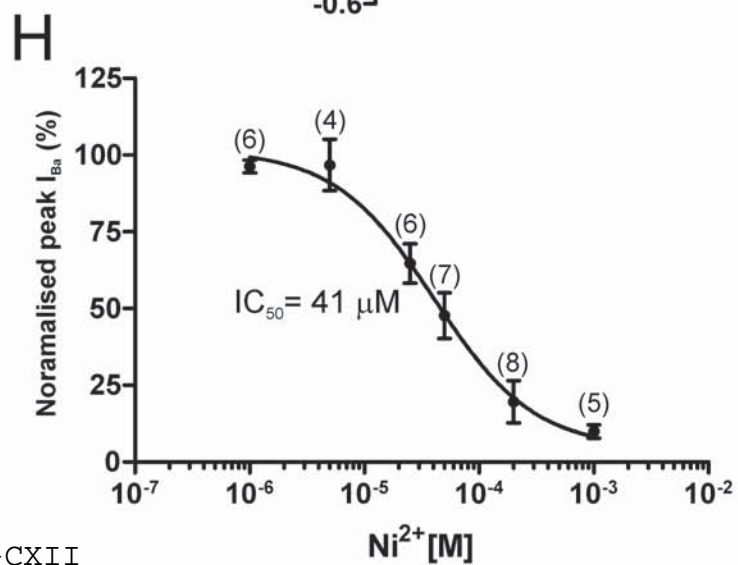
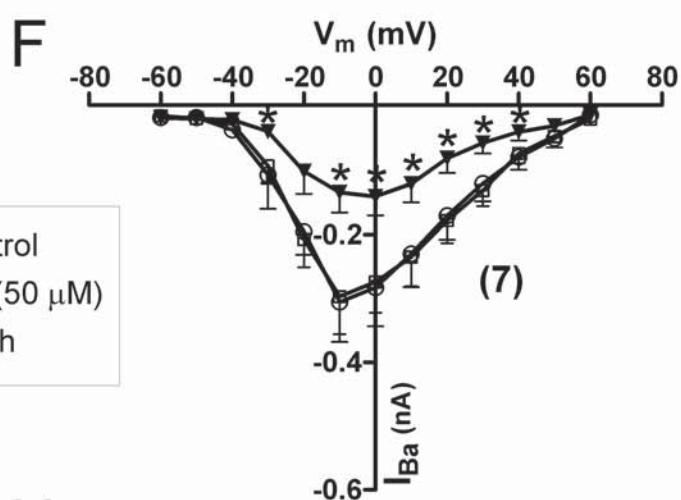
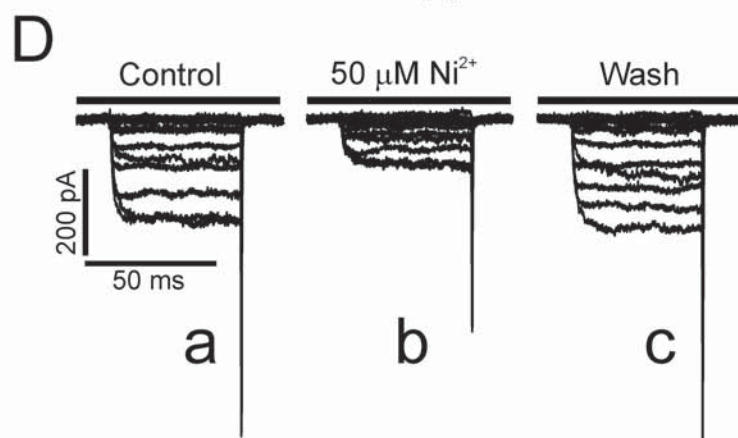
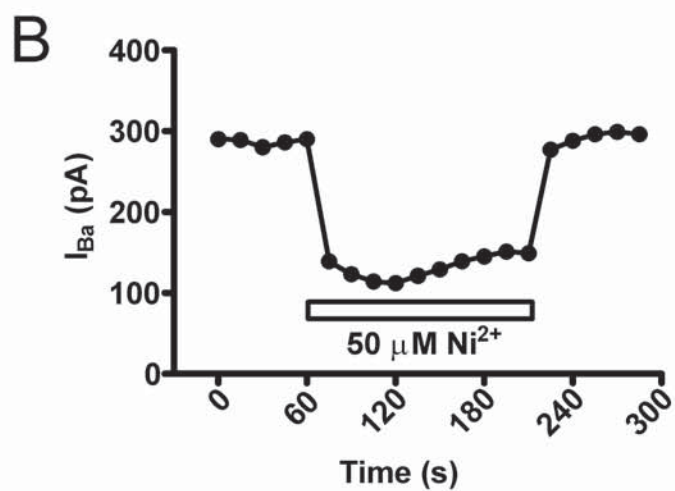


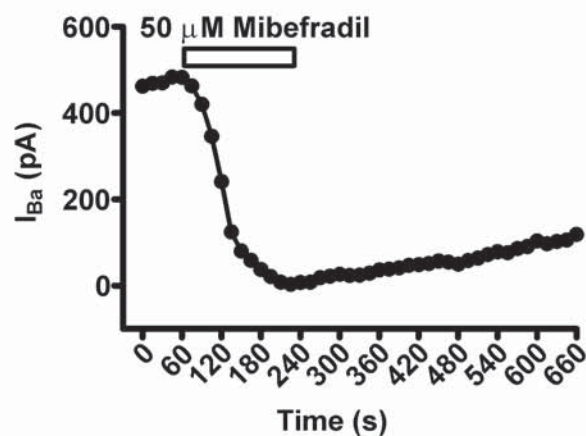
Figure 1

A-CXII

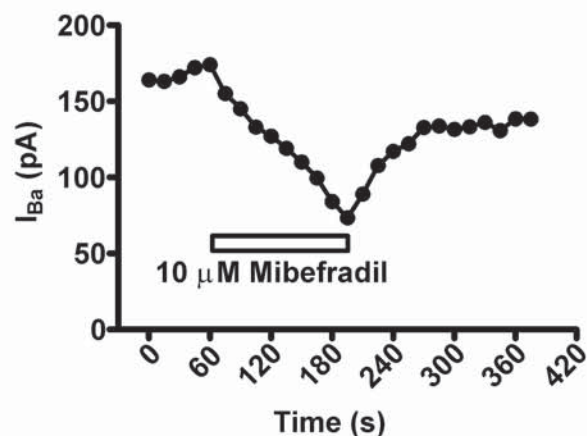
BCCs

RECCs

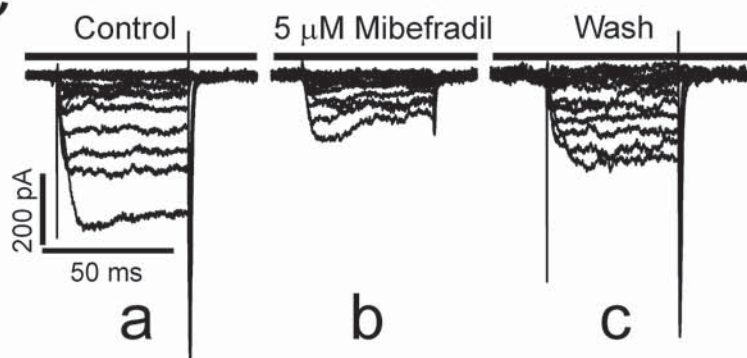
A



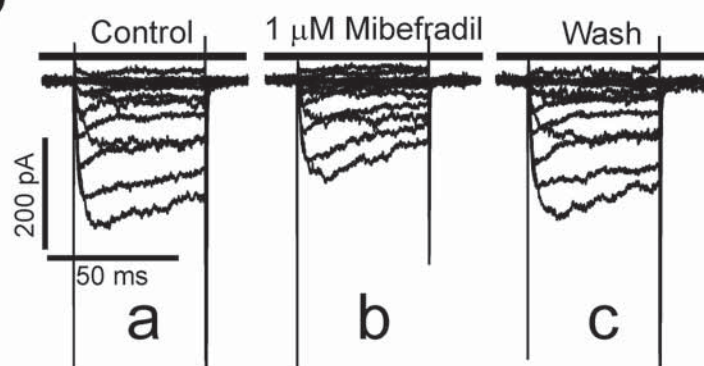
B



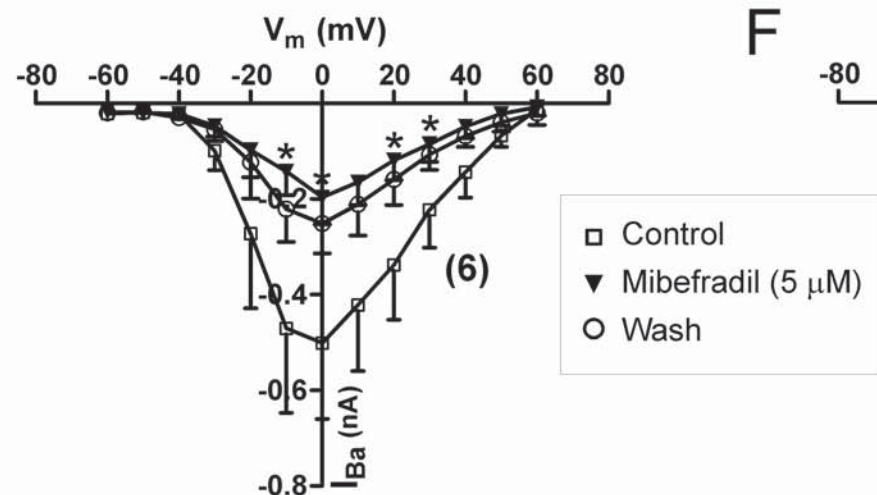
C



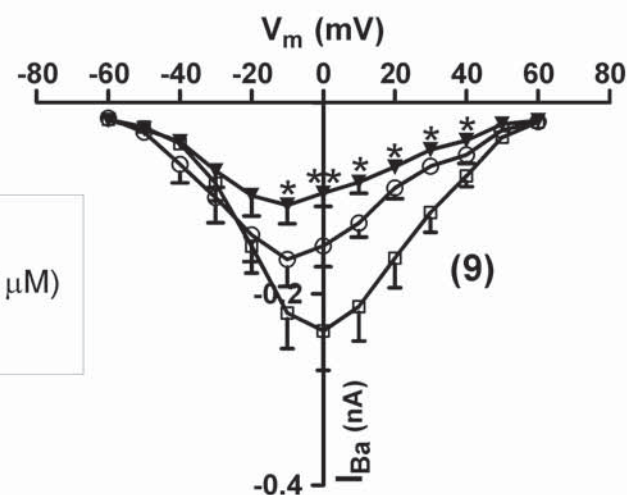
D



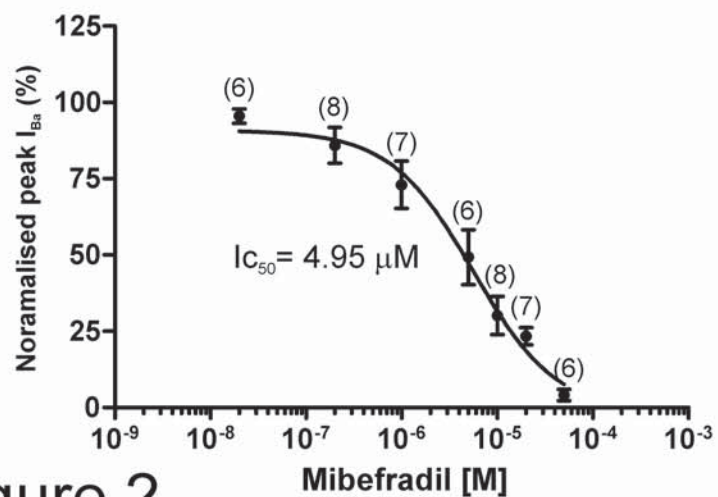
E



F



G



H

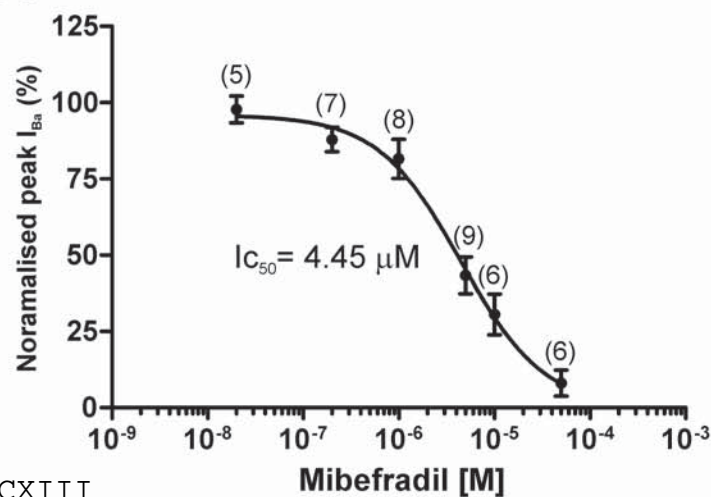


Figure 2

A-CXIII

BCCs

RECCs

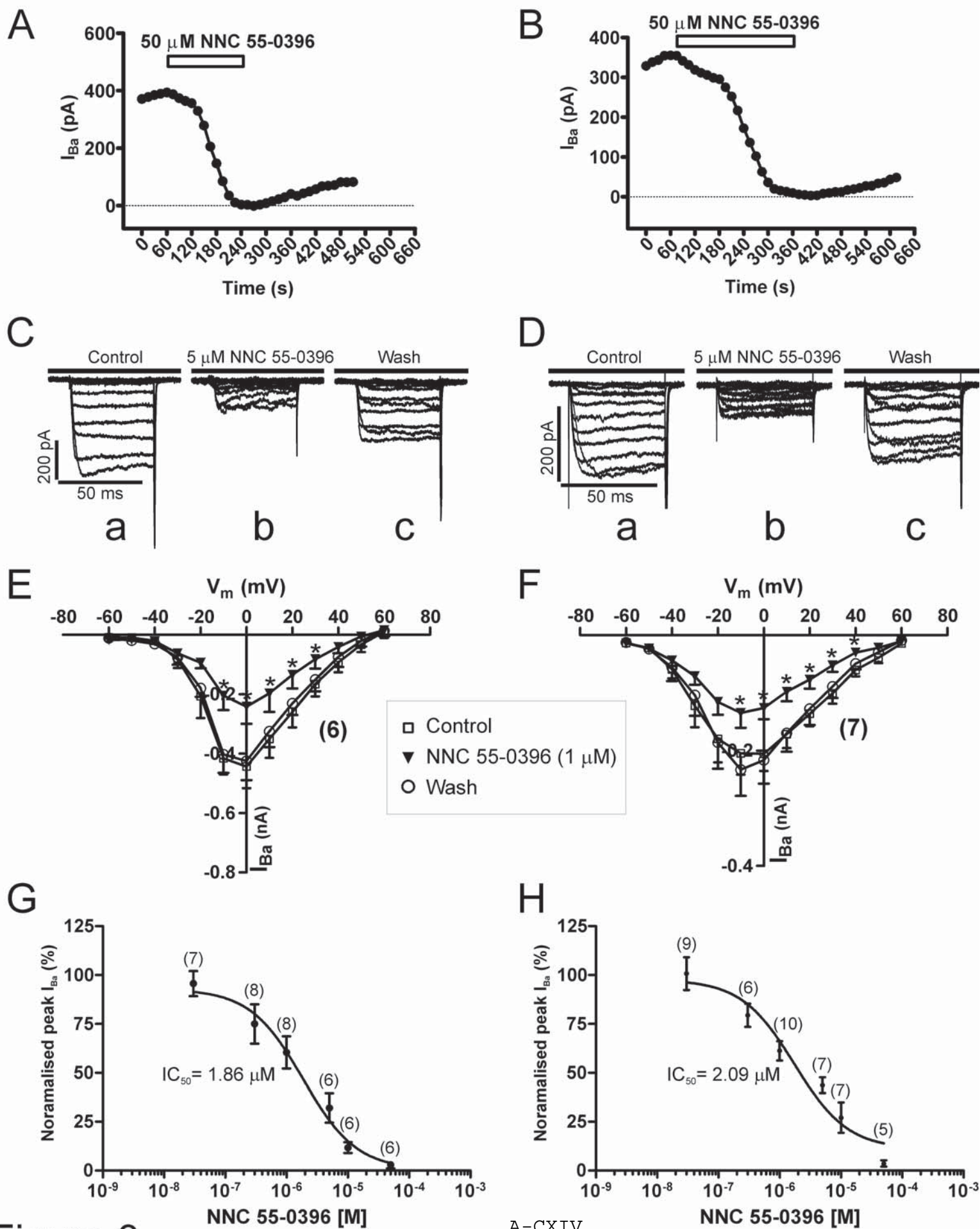


Figure 3

A-CXIV

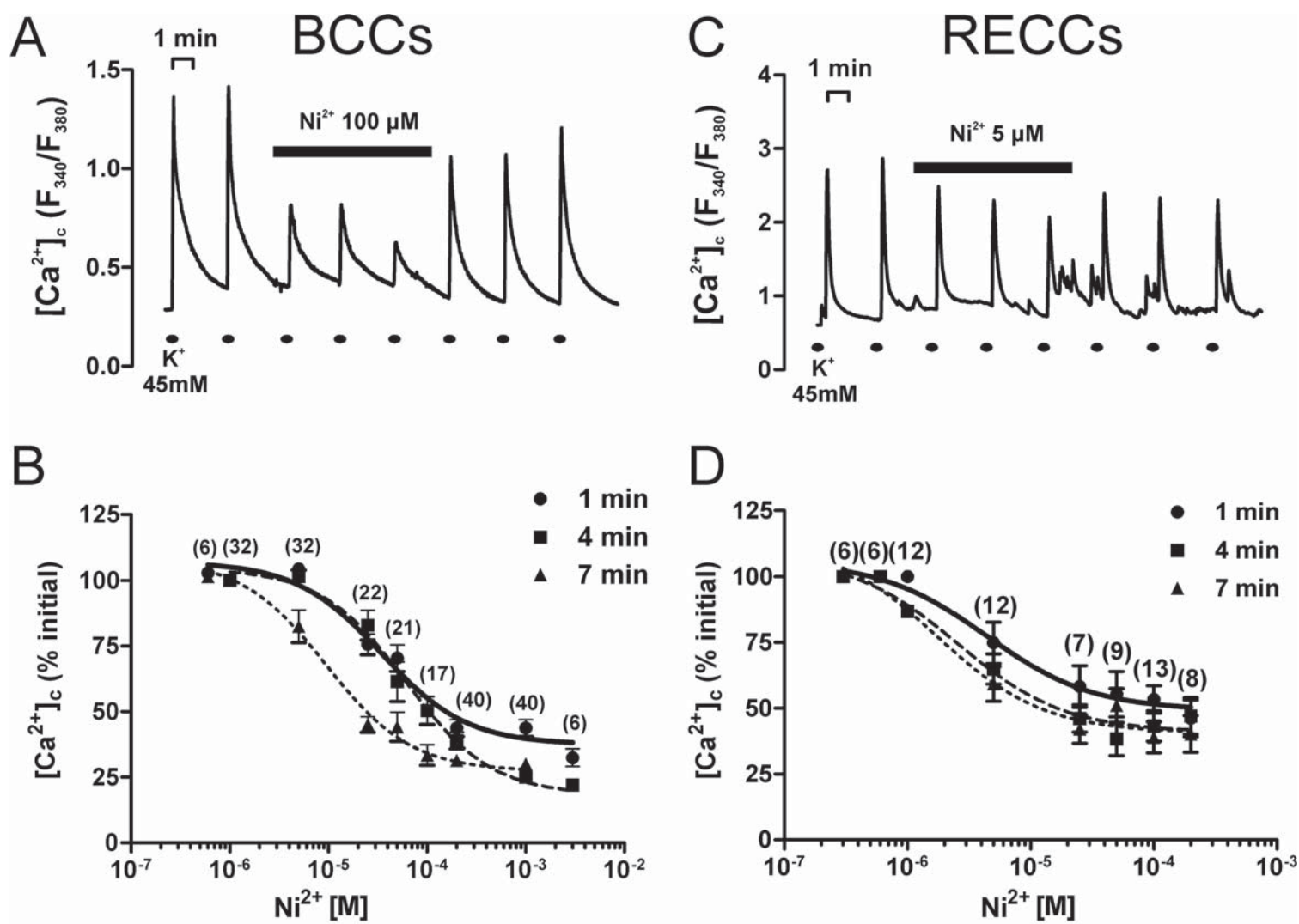


Figure 4

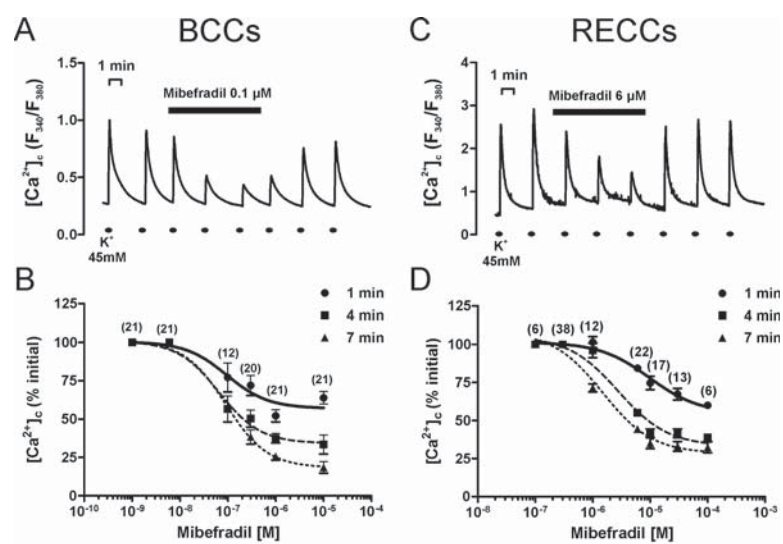


Figure 5

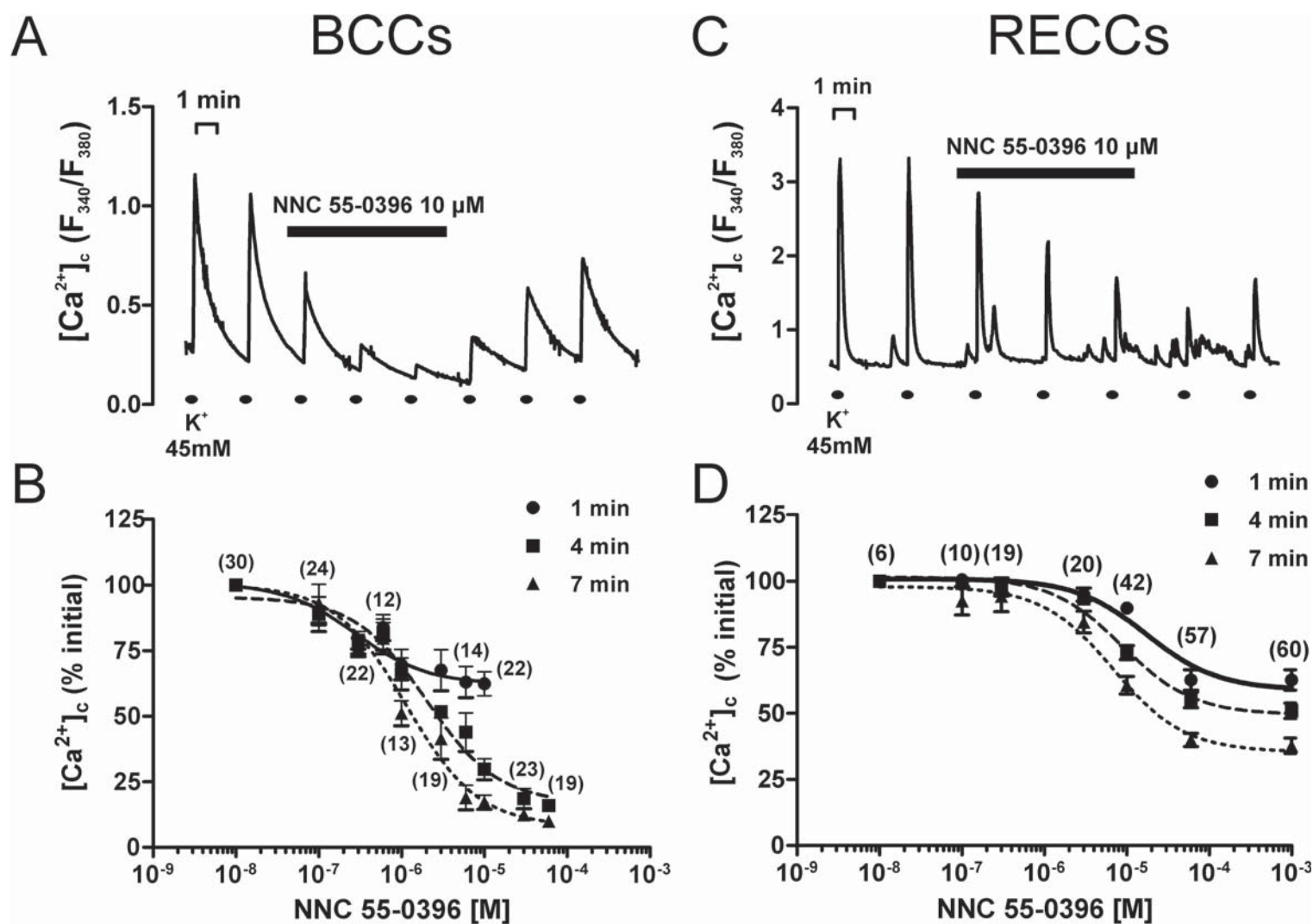


Figure 6

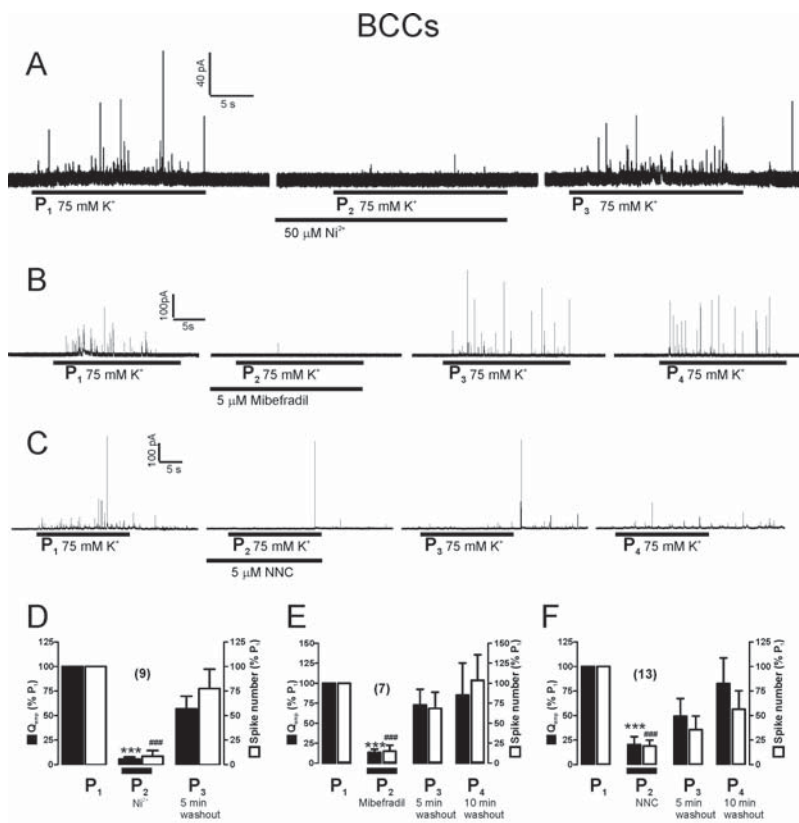


Figure 7

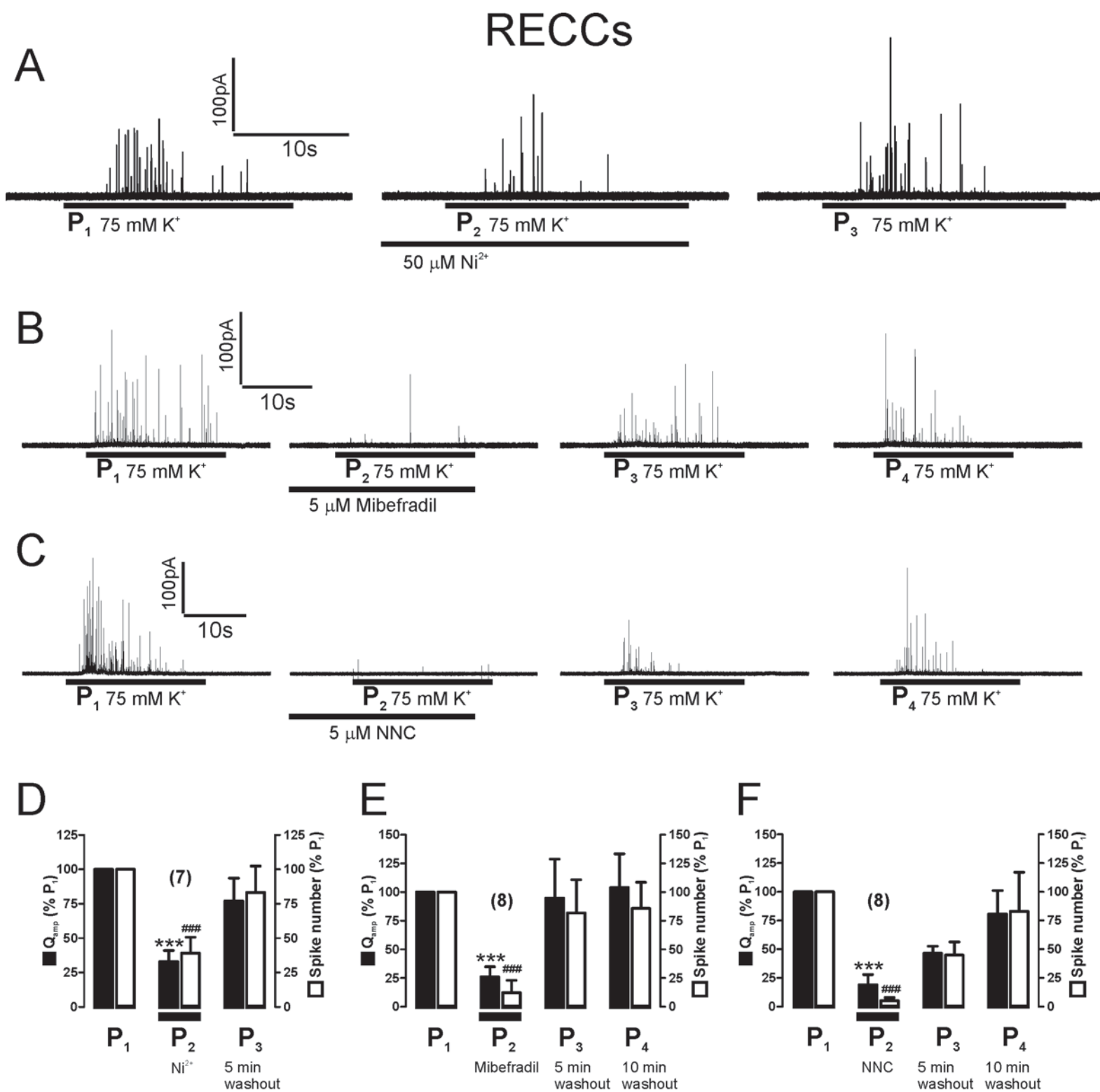
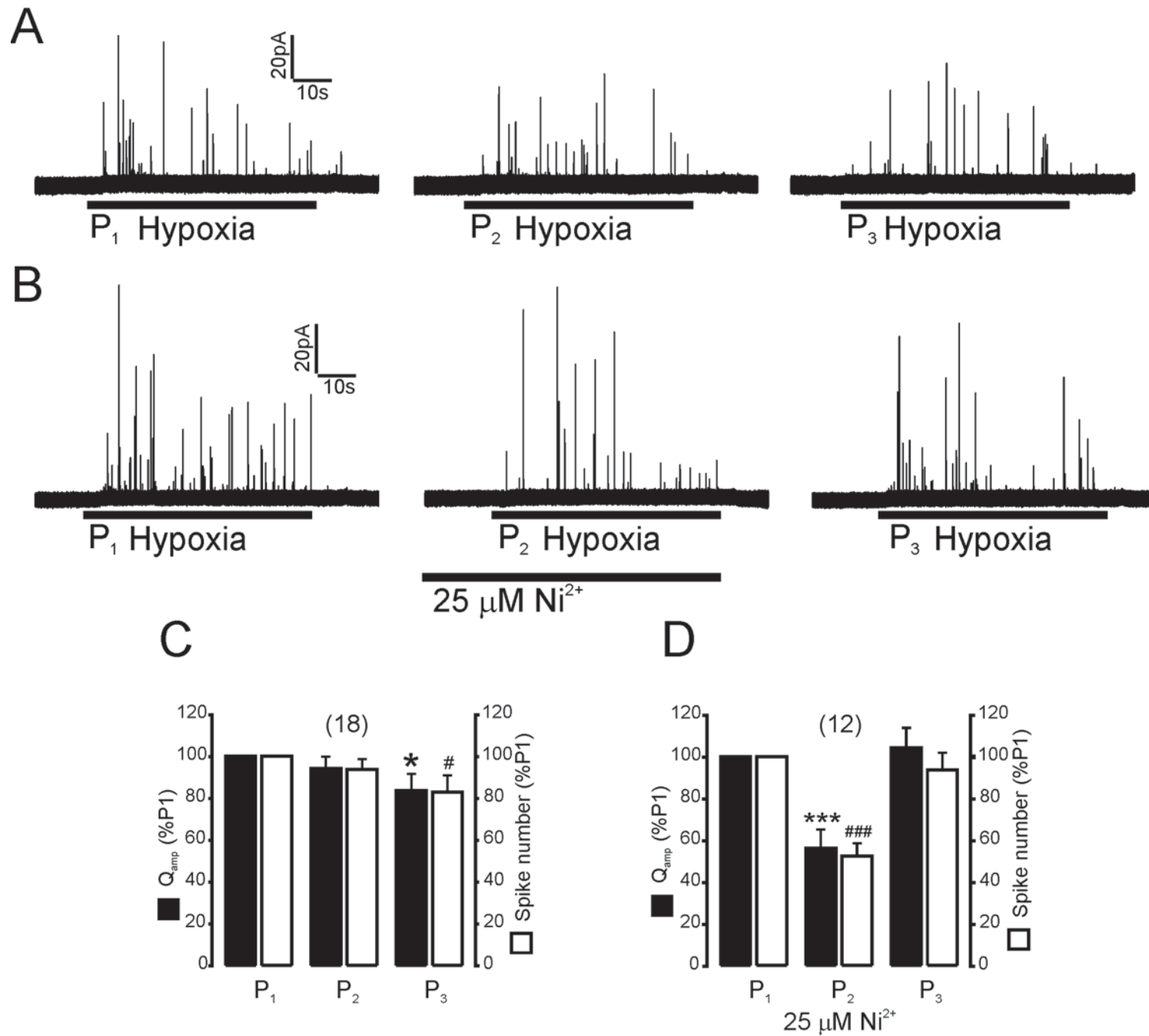


Figure 8

RECCs



A-CXX

Figure 9

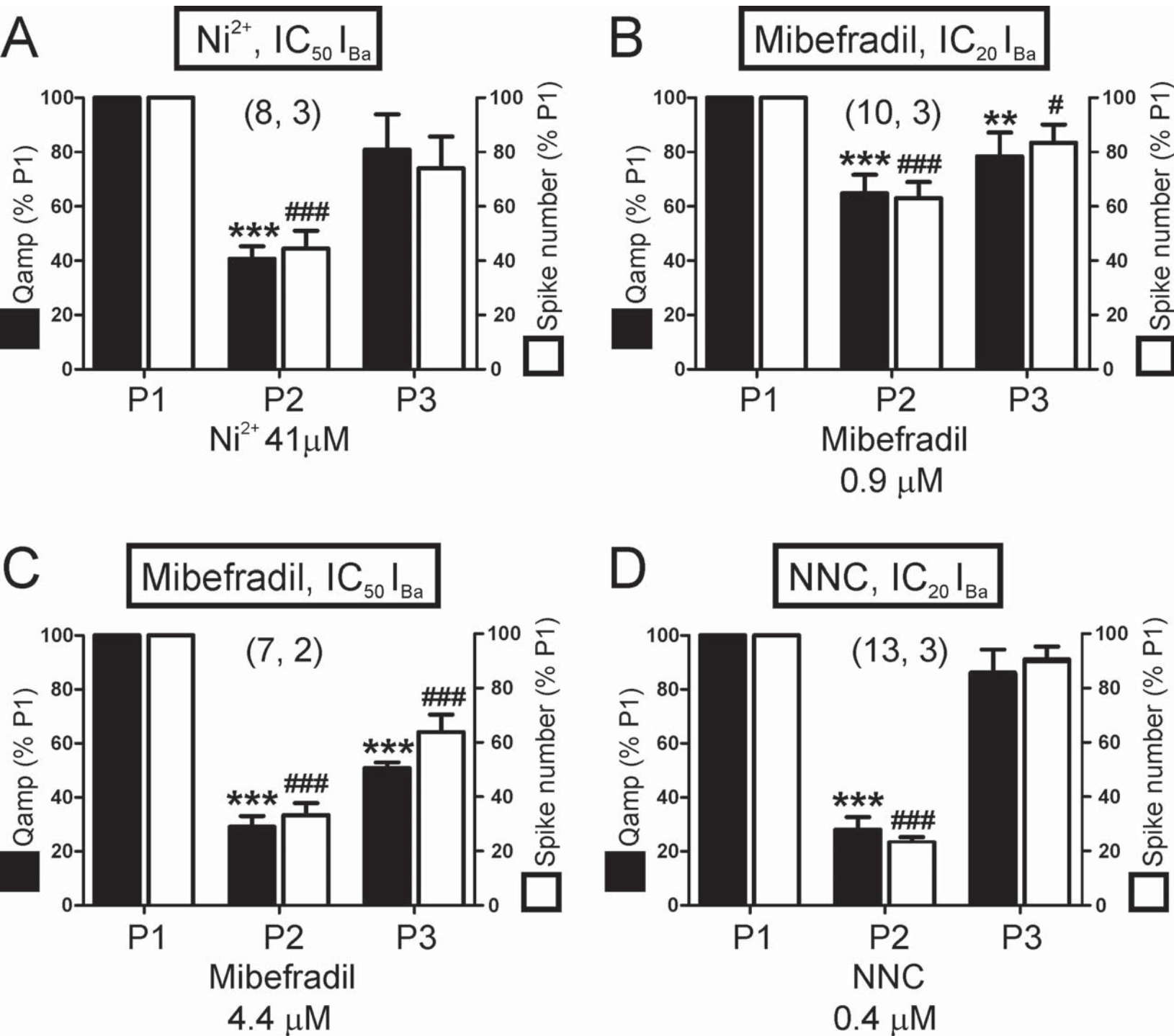
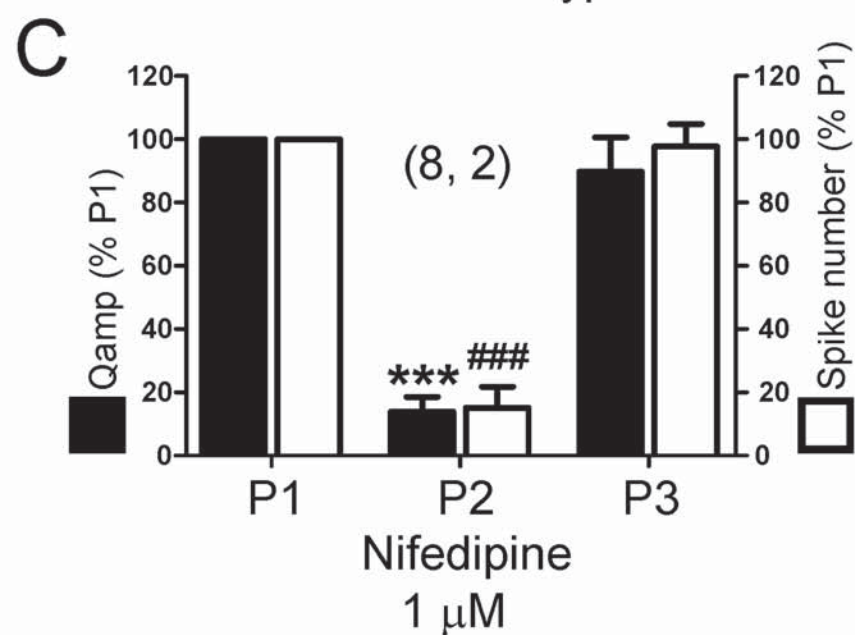
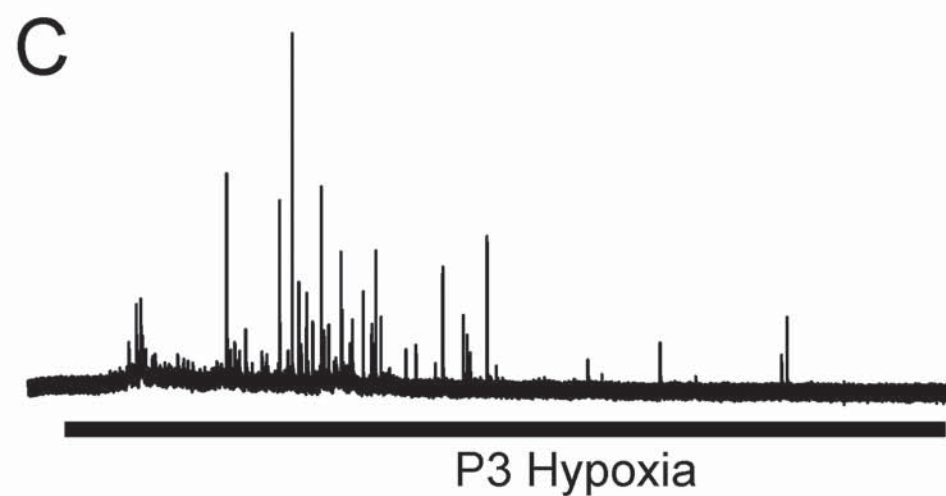
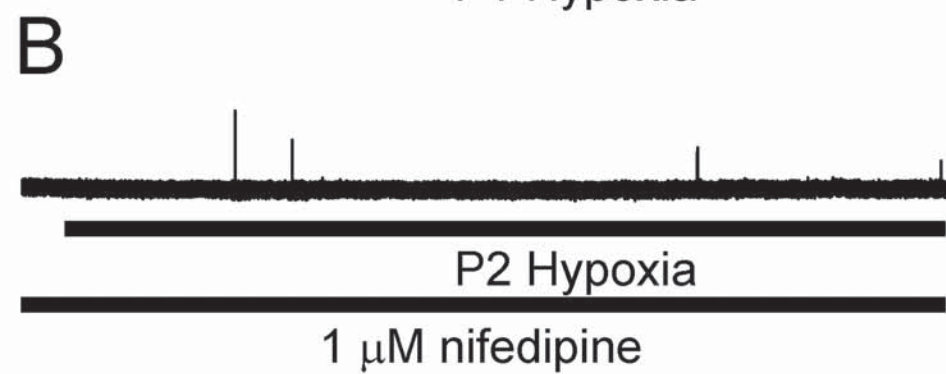
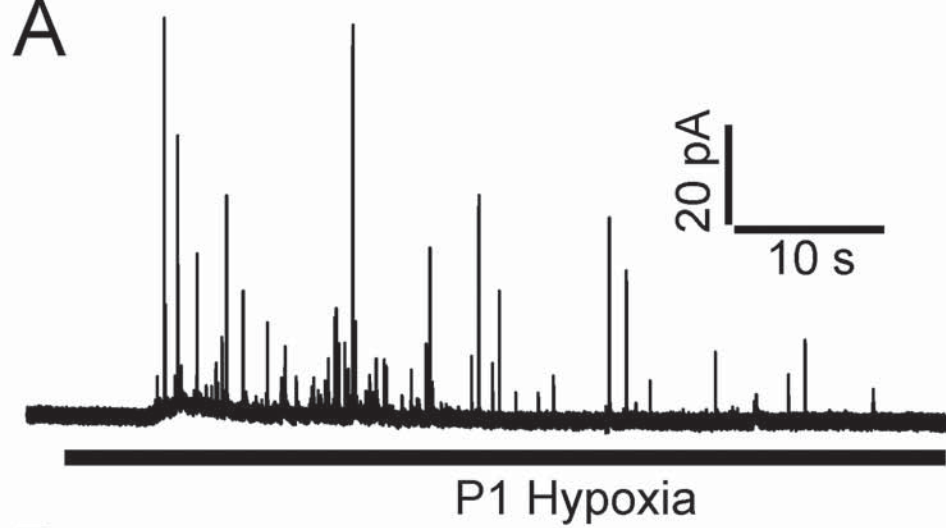


Figure 10



A-CXXII

Figure 11

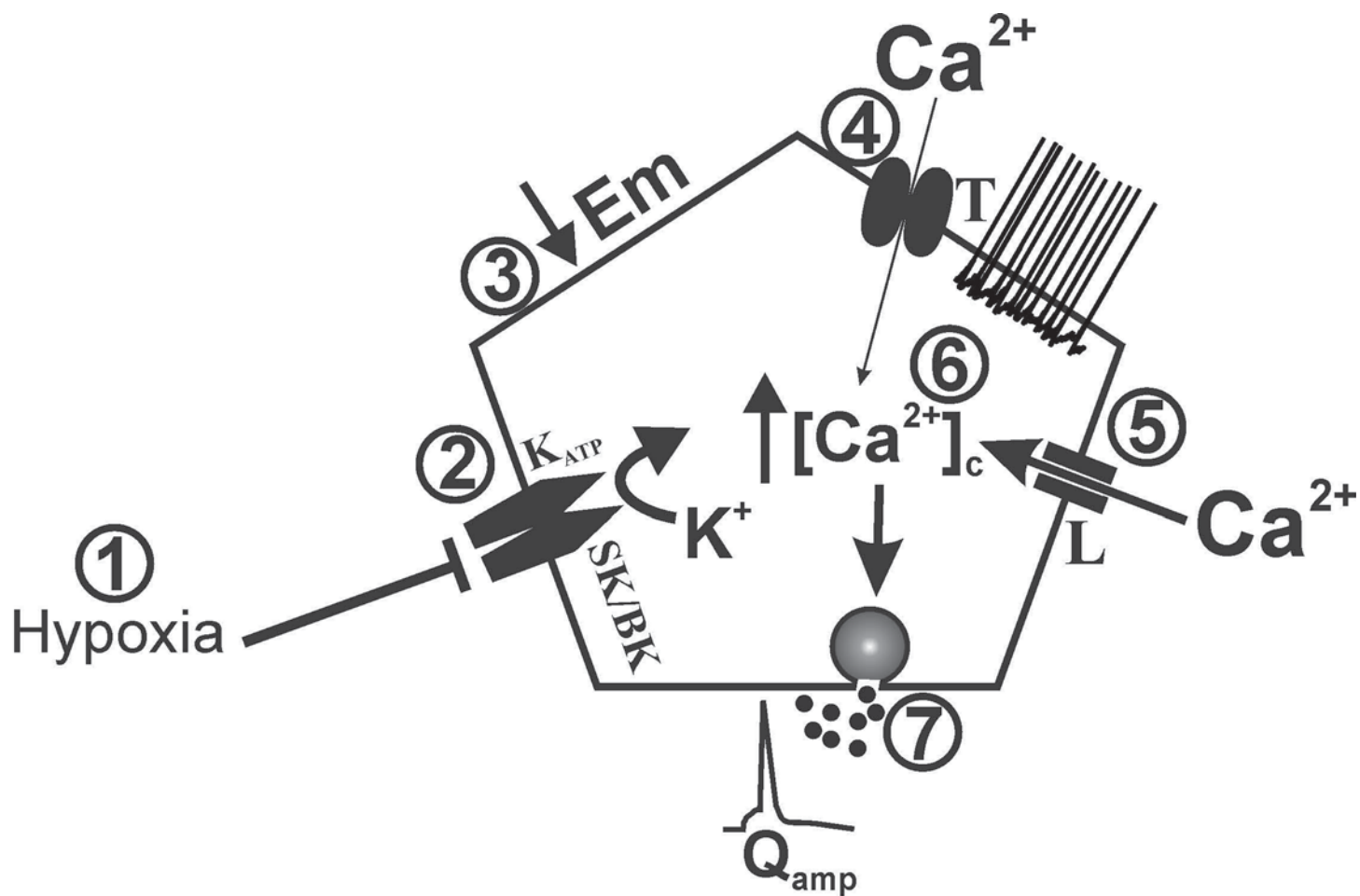


Figure 12

ARTÍCULO 6



Multi-target novel neuroprotective compound ITH33/IQM9.21 inhibits calcium entry, calcium signals and exocytosis

Marcos Maroto^{a,b}, Antonio M.G. de Diego^{a,b}, Elisa Albiñana^{a,b}, José C. Fernandez-Morales^{a,b}, Afonso Caricati-Neto^{a,e}, Aron Jurkiewicz^{a,e}, Matilde Yáñez^{a,f}, María Isabel Rodríguez-Franco^d, Santiago Conde^d, Mariana P. Arce^d, Jesús M. Hernández-Guijo^{a,b,c}, Antonio G. García^{a,b,c,*}

^a Instituto Teófilo Hernando, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

^b Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

^c Instituto Sanitario de Investigación, Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de la Princesa, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

^d Instituto de Química Médica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, Madrid, Spain

^e Departamento de Farmacología, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Brazil

^f Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2011

Received in revised form 7 June 2011

Accepted 16 June 2011

Available online 11 August 2011

Keywords:

ITH33/IQM9.21

Calcium channels

Calcium-dependent potassium channels

Calcium signalling

Exocytosis

ABSTRACT

Compound ITH33/IQM9.21 (ITH/IQM) belongs to a new family of L-glutamic acid derivatives with antioxidant and neuroprotective properties on *in vitro* and *in vivo* models of stroke. Because neuronal damage after brain ischemia is tightly linked to excess Ca^{2+} entry and neuronal Ca^{2+} overload, we have investigated whether compound ITH/IQM antagonises the elevations of the cytosolic Ca^{2+} concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) and the ensuing exocytotic responses triggered by depolarisation of bovine chromaffin cells. In fluo-4-loaded cell populations, ITH/IQM reduced the K^+ -evoked $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transients with an IC_{50} of $5.31 \mu\text{M}$. At $10 \mu\text{M}$, the compound decreased the amplitude and area of the Ca^{2+} transient elicited by challenging single fura-2-loaded cells with high K^+ , by 40% and 80%, respectively. This concentration also caused a blockade of K^+ -induced catecholamine release at the single-cell level (78%) and cell populations (55%). These effects are likely due to blockade of the whole-cell inward Ca^{2+} currents ($\text{IC}_{50} = 6.52 \mu\text{M}$). At $10 \mu\text{M}$, ITH/IQM also inhibited the Ca^{2+} -dependent outward K^+ current, leaving untouched the voltage-dependent component of I_K . The inward Na^+ current was unaffected. Inhibition of depolarisation-elicited Ca^{2+} entry, $[\text{Ca}^{2+}]_c$ elevation and exocytosis could contribute to the neuroprotective effects of ITH/IQM in vulnerable neurons undergoing depolarisation during brain ischemia.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: ITH, Instituto Teófilo Hernando; IQM, Instituto de Química Médica; ITH33/IQM9.21, (*N*-Benzoyl-LGlu[NH-2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethyl]-O-nHex) oxalate salt; BBB, Blood Brain Barrier; $[\text{Ca}^{2+}]_c$, cytosolic calcium concentrations; AD, Alzheimer's disease; I_{Ca} , whole-cell inward calcium currents; I_{Na} , whole-cell inward sodium current; $I_{K(\text{Ca})}$, Ca^{2+} -dependent K^+ currents; A β , amyloid beta; ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis; mPTP, mitochondrial permeability transition pore; PD, Parkinson's disease; HD, Huntington's disease; VDCC, voltage-dependent calcium channels; SOD1, superoxide dismutase 1; AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA, [ethylenedis(oxyethylenenitrilo)] tetraacetic acid; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium.

* Corresponding author at: Instituto Teófilo Hernando (ITH), Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Arzobispo Morcillo, 4 28029 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 4973120; fax: +34 91 4973120.

E-mail address: agg@uam.es (A.G. García).

1. Introduction

Calcium signalling couples membrane excitability to physiological functions of neurons, which are extremely sensitive to changes of cytosolic concentrations of ionised Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_c$. These Ca^{2+} transients control vital functions such as neurotransmitter release [1], gene expression [2] as well as short- and long-term synaptic plasticity [3]. Because of this extreme sensitivity of neurons to variations in Ca^{2+} signal, even subtle defects and abnormalities in the complex machinery that control Ca^{2+} homeostasis might lead to apoptotic neuronal death over short-time periods [4].

The role of Ca^{2+} as a death trigger was first suggested by Albrecht Fleckenstein in 1974; he proposed that excess Ca^{2+} entry into myocytes could underlie the myocardial damage occurring during coronary ischemic disease. This was the basis for the development of the concept of calcium antagonists; by limiting excess Ca^{2+} entry through voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCCs), those drugs could protect cardiac tissues from damage elicited by ischemia [5]. Subsequent studies emphasised the general importance of this

ARTÍCULO 7



Cardiovascular Pharmacology

Resveratrol augments nitric oxide generation and causes store calcium release in chromaffin cells

Juan Fernando Padín^{a,b,*}, Antonio M.G. de Diego^{a,b}, José Carlos Fernández-Morales^{a,b}, Cristina Merino^{a,b}, Marcos Maroto^{a,b}, Enrique Calvo-Gallardo^{a,b}, Juan Alberto Arranz^{a,b,d}, Matilde Yáñez^{a,b,d}, Antonio G. García^{a,b,c}

^a Instituto Teófilo Hernando, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Spain

^b Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Spain

^c Servicio de Farmacología Clínica, Instituto de Investigaciones Sanitarias, Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Spain

^d Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela (USC), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 December 2011

Received in revised form 16 March 2012

Accepted 23 March 2012

Available online 3 April 2012

Keywords:

Chromaffin cell

Resveratrol

Calcium

Nitric oxide

Exocytosis

Hypertension

ABSTRACT

The cardiovascular protecting effect of the grape fruit trans-resveratrol has been explained among other factors, through augmentation of nitric oxide (NO) production in cardiovascular tissues. Another effect of low resveratrol concentration is the inhibition of single-vesicle quantal release of catecholamine from bovine adrenal chromaffin cells, that was recently suggested to be an additional factor contributing to its beneficial cardiovascular effects. We have investigated here the effects of a low concentration of trans-resveratrol (1 μ M) on Ca^{2+} and NO signaling pathways in bovine chromaffin cells, in an attempt to understand the mechanism underlying its previously reported inhibitory effects on quantal secretion. In cells loaded with fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2), we have found that 1 μ M resveratrol produces a transient elevation of the cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). This Ca^{2+} transient was drastically reduced when the Ca^{2+} store was depleted by ryanodine and dantrolene; it was also inhibited by N^o-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) and 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ). Furthermore, the Ca^{2+} transient was mimicked by NO donor S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP). Resveratrol also enhanced the production of nitrites and NO, and L-NAME blocked both responses; in contrast, augmentation by SNAP of nitrites and NO was unaffected by ODQ and was only partially inhibited by L-NAME. On the basis of these results, we are proposing that resveratrol is mitigating the catecholamine surge occurring during stress, through its ability to elicit mild local $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients and enhanced NO production, that blocks the last steps of exocytosis.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Extensive epidemiological studies led to the surprising conclusion that in spite of high-fat diet, sedentary life and widespread smoking the populations of Southern France and other Mediterranean areas had substantial lesser risk of coronary heart disease. This observation was coined as the French Paradox and the smaller cardiovascular risk was attributed to moderate regular consumption of red wine (Renaud and de Lorgeril, 1992). The putative cardioprotective agent was the wine polyphenol resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) that was subjected to several studies trying to clarify the mechanism(s) underlying such an effect. Thus, resveratrol has been found to exhibit vasodilatory properties (Gresele et al., 2011; Orallo et al., 2002), direct

cardioprotection (Wu and Hsieh, 2011), as well as anti-inflammatory, antioxidant and antiplatelet activities and the modulation of lipoprotein metabolism (Bradamante et al., 2004; Orallo et al., 2002; Wu et al., 2001).

Another high-risk factor for cardiovascular disease is excessive levels of circulating catecholamines as a result of hyperactivation of the sympathoadrenal axis. This occurs for instance as a compensatory mechanism taking place during cardiac failure as a consequence of an acute myocardial infarction (Kaye et al., 1995; Lymperopoulos et al., 2007). In fact, blockers of β -adrenergic receptors are cardioprotective in this clinical setting and in myocardial infarction (Christensen et al., 2011).

A catecholamine surge from sympathetic nerve terminals and adrenal medullary chromaffin cells occurs during stressful conflicts of daily life; this surge augments the blood levels of catecholamines that when persistent, may lead to cardiac arrhythmias and/or precipitation of a coronary ischemic episode. It was therefore hypothesized that resveratrol could afford cardioprotection by mitigating the release of catecholamine during stress. This was tested in cultured bovine adrenal

* Corresponding author at: Instituto Teófilo Hernando, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Arzobispo Morcillo, 4, 28029 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 4973120 21; fax: +34 91 4973120.

E-mail address: jf.padin@gmail.com (J.F. Padín).

ARTÍCULO 8

Blockade by Nanomolar Resveratrol of Quantal Catecholamine Release in Chromaffin Cells

José Carlos Fernández-Morales, Matilde Yáñez, Francisco Orallo, Lorena Cortés, José Carlos González, Jesús Miguel Hernández-Guijo, Antonio G. García, and Antonio M. G. de Diego

Instituto Teófilo Hernando (J.C.F.-M., M.Y., L.C., J.C.G., J.M.H.-G., A.G.G., A.M.G.D.), Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina (J.M.H.-G., A.G.G.), Universidad Autónoma de Madrid, Spain; Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Spain (A.G.G.); and Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Spain (M.Y., F.O.)

Received May 16, 2010; accepted July 14, 2010

ABSTRACT

The cardiovascular protecting effects of resveratrol, an antioxidant polyphenol present in grapes and wine, have been attributed to its vasorelaxing effects and to its anti-inflammatory, antioxidant, and antiplatelet actions. Inhibition of adrenal catecholamine release has also been recently implicated in its cardioprotecting effects. Here, we have studied the effects of nanomolar concentrations of resveratrol on quantal single-vesicle catecholamine release in isolated bovine adrenal chromaffin cells. We have found that 30 to 300 nM concentrations of resveratrol blocked the acetylcholine (ACh) and high K⁺-evoked quantal catecholamine release, amperometrically measured with a carbon fiber microelectrode. At these concentrations, resveratrol did not affect the whole-cell inward currents

through nicotinic receptors or voltage-dependent sodium and calcium channels, neither the ACh- or K⁺-elicited transients of cytosolic Ca²⁺. Blockade by nanomolar resveratrol of secretion in ionomycin- or digitonin-treated cells suggests an intracellular site of action beyond Ca²⁺-dependent exocytotic steps. The fact that nanomolar resveratrol augmented cGMP is consistent with the view that resveratrol could be blocking the quantal secretion of catecholamine through a nitric oxide-linked mechanism. Because this effect occurs at nanomolar concentrations, our data are relevant in the context of the low circulating levels of resveratrol found in moderate consumers of red wines, which could afford cardioprotection by mitigating the catecholamine surge occurring during stress.

Introduction

Increasing interest in the exploration of the pharmacological profile of resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene), a compound present in grapes and wine, arose when it was associated to a putative cardiovascular protecting action. A number of large-scale epidemiological studies suggested that prolonged moderate consumption of red wine by Southern

French and other Mediterranean populations was associated with a very low incidence of coronary heart disease, despite a high-fat diet, little exercise, and widespread smoking; this observation was coined as the French Paradox (Renaud and de Lorgeril, 1992). The French Paradox hypothesis generated much interest in the study of the effects of resveratrol on various cardiovascular risk-like parameters. For instance, vessels precontracted with phenylephrine or K⁺ are relaxed by resveratrol (Chen and Pace-Asciak, 1996; Orallo et al., 2002). The fact that resveratrol activates soluble and particulate guanylate cyclase and augments vascular cGMP levels suggests the involvement of the L-arginine-NO pathway. Prevention of nitric oxide (NO) degradation by inhibiting NAD(P) oxidase has also been linked to resveratrol (Orallo et al., 2002). A direct protecting action on the heart through an NO-dependent mechanism has also been suggested previously (Hattori et al., 2002); such protection was associated to activation by resveratrol of a cGMP/protein kinase G path-

Supported in part by Ministerio de Ciencia e Innovación [Grant SAF2006-03589]; Agencia Laín Entralgo, Comunidad de Madrid [Grant NDE 07/9]; Fundación Centro de Investigación de Enfermedades Neurológicas, Instituto de Salud Carlos III [Grants PI016/09, PI080227]; Comunidad de Madrid [Grant S-SAL-0275-2006]; Instituto de Salud Carlos III [Grant RD 06/0026]; Ministerio de Sanidad y Consumo [Grant Fondo de Investigación Sanitaria PI061537]; and Consellería de Innovación e Industria de la Xunta de Galicia [Grants INCITE07PXI203039ES, INCITE08E1R203054ES, INCITE08CSA019203PR].

We acknowledge financial support from Centro de Estudios de América Latina-Universidad Autónoma Metropolitana-Banco de Santander.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/mol.110.066423.

ABBREVIATIONS: ACh, acetylcholine; nAChR, nicotinic acetylcholine receptor; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; 75K⁺, 75 mM K⁺/low Na⁺ solution; Q_{amp}, amperometric charge; MCN-A-343, 4-[[[(3-chlorophenyl)amino]carbonyl]oxy]-N,N,N-trimethyl-2-butyne-1-aminium chloride; BayK8644, 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-5-nitro-4-[2-(trifluoromethyl) phenyl]-3-pyridinecarboxylic acid, methyl ester.

ARTÍCULO 9

1

2 **The plasmalemmal sodium-calcium exchanger shapes**
3 **the calcium and exocytotic signals of chromaffin cells**
4 **at physiological temperature**

5

6 Juan-Fernando Padín^{1,2,#}, José-Carlos Fernández-Morales^{1,2,#},
7 Román Olivares⁵, Stefan Vestring^{1,6}, Juan-Alberto Arranz-
8 Tagarro^{1,4}, Enrique Calvo-Gallardo^{1,2}, Ricardo de Pascual^{1,2}, Luís
9 Gandía^{1,2} and Antonio G. García^{1,2,3}

10

11 ¹*Instituto Teófilo Hernando.* ²*Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad*
12 *de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.* ³*Servicio de*
13 *Farmacología Clínica, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario de la*
14 *Princesa, UAM, Madrid, Spain.* ⁴*Departamento de Farmacología, Facultad de*
15 *Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.*
16 ⁵*Instituto de Neurociencia, Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain.*
17 ⁶*Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Germany.*

18

19 Running title: **Plasmalemmal NCX shapes Ca²⁺ and exocytotic signals at 37 °C**

20

21

22 Contact information:

23 Antonio G. García
24 Instituto Teófilo Hernando
25 Universidad Autónoma de Madrid
26 Avda. Arzobispo Morcillo, 4
27 28029, Madrid (Spain)
28 Phone number: +34914973120/21
29 Fax number: +34914973453
30 e-mail: agg@uam.es

31 [#]*Equal contributors*

ARTÍCULO 10

Stabilizers of Neuronal and Mitochondrial Calcium Cycling as a Strategy for Developing a Medicine for Alzheimer's Disease

José-Carlos Fernández-Morales,^{†,‡,⊥} Juan-Alberto Arranz-Tagarro,^{†,‡,||,⊥} Enrique Calvo-Gallardo,^{†,‡} Marcos Maroto,^{†,‡} Juan-Fernando Padín,^{†,‡} and Antonio G. García*,^{†,‡,§}

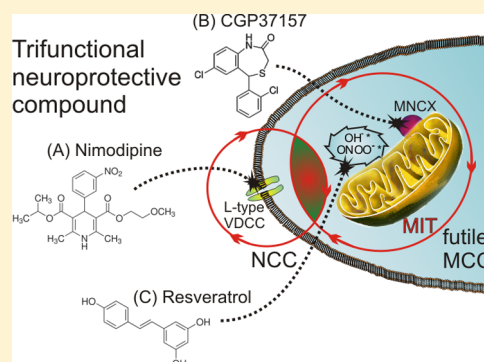
[†]Instituto Teófilo Hernando, [‡]Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

[§]Servicio de Farmacología Clínica, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, Spain

^{||}Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

ABSTRACT: For the last two decades, most efforts on new drug development to treat Alzheimer's disease have been focused to inhibit the synthesis of amyloid beta ($A\beta$), to prevent $A\beta$ deposition, or to clear up $A\beta$ plaques from the brain of Alzheimer's disease (AD) patients. Other pathogenic mechanisms such as the hyperphosphorylation of the microtubular tau protein (that forms neurofibrillary tangles) have also been addressed as, for instance, with inhibitors of the enzyme glycogen synthase-3 kinase beta (GSK3 β). However, in spite of their proven efficacy in animal models of AD, all these compounds have so far failed in clinical trials done in AD patients. It seems therefore desirable to explore new concepts and strategies in the field of drug development for AD. We analyze here our hypothesis that a trifunctional chemical entity acting on the L subtype of voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCCs) and on the mitochondrial Na^+/Ca^{2+} exchanger (MNCX), and having additional antioxidant properties, may efficiently delay or stop the death of vulnerable neurons in the brain of AD patients. In recent years, evidence has accumulated indicating that enhanced neuronal Ca^{2+} cycling (NCC) and futile mitochondrial Ca^{2+} cycling (MCC) are central stage in activating calpain and calcineurin, as well as the intrinsic mitochondrial pathway for apoptosis, leading to death of vulnerable neurons. An additional contributing factor to neuronal death is the excess free radical production linked to distortion of Ca^{2+} homeostasis. We propose that an hybrid compound containing a dihydropyridine moiety (to block L channels and mitigate Ca^{2+} entry) and a benzothiazepine moiety (to block the MNCX and slow down the rate of Ca^{2+} efflux from the mitochondrial matrix into the cytosol), as well as a polyphenol moiety (to sequester excess free radicals) could break down the pathological enhanced NCC and MCC, thus delaying the initiation of apoptosis and the death of vulnerable neurons. In so doing, such a trifunctional compound could eventually become a neuroprotective medicine capable of delaying disease progression in AD patients.

KEYWORDS: Alzheimer's disease, neuronal calcium cycling, mitochondrial calcium cycling, calcium and cell death, L-type calcium channel, mitochondrial sodium–calcium exchanger, functional tetrad, multitarget compounds, neurotoxicity, neuroprotection



The calcium ion (Ca^{2+}) acts as an ubiquitous intracellular messenger to regulate a pleiad of physiological functions. Being a divalent cation that binds to multiple proteins, ion channels, and receptors, together with the existence of a four order magnitude gradient from the extracellular to the intracellular space, makes Ca^{2+} a suitable messenger. In excitable cells and particularly in neurons of the central nervous system that are continuously firing action potentials at various frequencies, Ca^{2+} ions undergo an endless cycling of Ca^{2+} influx through plasmalemmal Ca^{2+} channels, its intracellular buffering by Ca^{2+} binding proteins (CBPs) and organelles, particularly the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria, Ca^{2+} release from these organelles into the cytosol, and Ca^{2+} efflux through plasmalemmal Ca^{2+} transporters, namely, the ATPase

Ca^{2+} pump and the Na^+/Ca^{2+} exchanger. Thus, there are two " Ca^{2+} circuits" that we will refer to in this review as neuronal Ca^{2+} cycling (NCC) and mitochondrial Ca^{2+} cycling (MCC). These Ca^{2+} circuits serve to regulate important neuronal functions such as the synaptic release of neurotransmitters, or the respiration rate of mitochondria by Ca^{2+} -dependent dehydrogenases, that couple bioenergetics through ATP synthesis to neuronal activity. Disruption of NCC and/or

Special Issue: Alzheimer's Disease

Received: July 25, 2012

Accepted: August 29, 2012



ARTÍCULO 11



Cytosolic organelles shape calcium signals and exo–endocytotic responses of chromaffin cells

Antonio G. García^{a,b,c,*}, Fernando Padín^{a,b,1}, José C. Fernández-Morales^{a,b}, Marcos Maroto^{a,b}, Javier García-Sancho^d

^a Instituto Teófilo Hernando, Instituto de Investigaciones Sanitarias del Hospital de la Princesa, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

^b Departamento de Farmacología y Terapéutica, Instituto de Investigaciones Sanitarias del Hospital de la Princesa, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

^c Servicio de Farmacología Clínica, Instituto de Investigaciones Sanitarias del Hospital de la Princesa, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

^d Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), Universidad de Valladolid and CSIC, c/Sanz y Forés, 3, 47003 Valladolid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2011

Received in revised form 2 December 2011

Accepted 5 December 2011

Available online 29 December 2011

Keywords:

Calcium tetrads
Chromaffin cells
Calcium signalling
Calcium microdomains
Exocytosis
Endocytosis
Mitochondria
Endoplasmic reticulum
Ca²⁺ cycling

ABSTRACT

The concept of stimulus–secretion coupling was born from experiments performed in chromaffin cells 50 years ago. Stimulation of these cells with acetylcholine enhances calcium (Ca²⁺) entry and this generates a transient elevation of the cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c) that triggers the exocytotic release of catecholamines. The control of the [Ca²⁺]_c signal is complex and depends on various classes of plasmalemmal calcium channels, cytosolic calcium buffers, the uptake and release of Ca²⁺ from cytoplasmic organelles, such as the endoplasmic reticulum, mitochondria, chromaffin vesicles and the nucleus, and Ca²⁺ extrusion mechanisms, such as the plasma membrane Ca²⁺-stimulated ATPase, and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. Computation of the rates of Ca²⁺ fluxes between the different cell compartments support the proposal that the chromaffin cell has developed functional calcium tetrads formed by calcium channels, cytosolic calcium buffers, the endoplasmic reticulum, and mitochondria nearby the exocytotic plasmalemmal sites. These tetrads shape the Ca²⁺ transients occurring during cell activation to regulate early and late steps of exocytosis, and the ensuing endocytotic responses. The different patterns of catecholamine secretion in response to stress may thus depend on such local [Ca²⁺]_c transients occurring at different cell compartments, and generated by redistribution and release of Ca²⁺ by cytoplasmic organelles. In this manner, the calcium tetrads serve to couple the variable energy demands due to exo–endocytotic activities with energy production and protein synthesis.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Stressful conflicts trigger a surge of the catecholamines adrenaline and noradrenaline that mobilize the body to survive by combating an enemy or to flee from danger, the so-called “fight or flight” response. This response is the end result of a secretory event that takes place in the adrenal medulla, the inner part of the two adrenal glands located just above the kidneys. The adrenal medulla is composed of chromaffin cells that secrete adrenaline and noradrenaline. These cells are of interest not only to explore the mechanisms underlying the “fight or flight” response, but also because they have been used for decades as excellent models to study the working of other secretory cells, in particular neurons.

Acetylcholine, the physiological neurotransmitter at the splanchnic nerve–chromaffin cell synapse [1], causes the release of catecholamines from the adrenal gland. This secretory response is suppressed in the absence of extracellular calcium (Ca²⁺) [2]. Also, acetylcholine enhances Ca²⁺ entry into adrenal medullary chromaffin cells [3]. On the basis of these and other pioneering experiments William W. Douglas coined the expression “stimulus–secretion coupling” as the basic mechanism involved in neurotransmitter and hormone secretion; Ca²⁺ was the coupling ion between the stimulus and the exocytotic response [4]. Since then, adrenal chromaffin cells from various mammalian species but mostly from bovine, rats and mice have extensively been used to study the relationship between the changes of cytosolic concentrations of free Ca²⁺ ions in the cytosol ([Ca²⁺]_c), its redistribution into organelles, its clearance from the cytosol and the exocytotic and endocytotic responses triggered by acetylcholine and other nicotinic and muscarinic receptor agonists, various agonists for G-protein coupled receptors and different depolarising stimuli including high concentrations of potassium (K⁺), square depolarising pulses or action potentials.

* Corresponding author at: Instituto Teófilo Hernando, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, C/Arzobispo Morcillo, 4, 28029 Madrid, Spain. Tel.: +34 914973120.

E-mail address: agg@uam.es (A.G. García).

¹ Equal contributors.

